

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ELIZABETE ARAÚJO CARNEIRO

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* TIPO B EM TOYOPEARL

FORTALEZA

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ELIZABETE ARAÚJO CARNEIRO

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* TIPO B EM TOYOPEARL

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana e Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA

2007

C288i Carneiro, Elizabete Araújo
Imobilização de lipase de *Candida antarctica* tipo B em Toyopearl /
Elizabete Araújo Carneiro, 2007
107 f.; il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'ana
Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos
e Bioquímicos

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2007.

1. Ligação covalente 2. Glutaraldeído 3. Etilenodiamina
4. Estabilidade térmica e operacional I . Sant'ana, Hosiberto Batista de
(orient.) II. Gonçalves, Luciana Rocha Barros (co-orient.)
III. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química IV. Título

CDD 660

ELIZABETE ARAÚJO CARNEIRO

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* TIPO B EM TOYOPEARL

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 28 / 08 / 2007

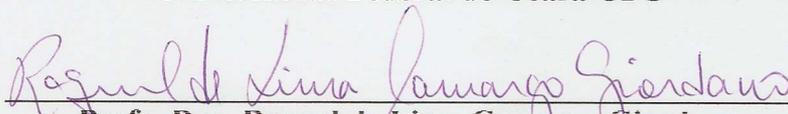
BANCA EXAMINADORA



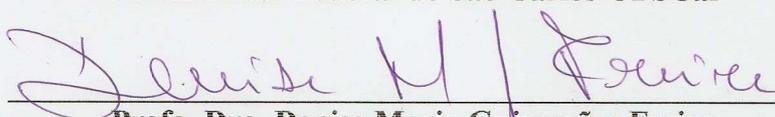
Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana (orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC



Profa. Dra. Luciana Rocha Gonçalves Barros (orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC



Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano
Universidade Federal de São Carlos-UFSCar



Profa. Dra. Denise Maria Guimarães Freire
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

**Aos meus pais Francisco e Edite
e à minha irmã Aninha**

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido disposição e concentração para execução deste trabalho.

Ao professor Hosiberto e à professora Luciana pela orientação do trabalho, pela confiança creditada a mim e pela contribuição para o meu desenvolvimento profissional.

À minha família, pelo apoio e incentivo.

Aos professores, pela dedicação, compreensão e incentivo.

À professora Raquel por disponibilizar o Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Engenharia Química da UFSCar e pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Andréa por sua cordialidade e disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

Aos amigos do mestrado Valdez, Arruda, Anayla, Karine, Josy, Juliana, Leonardo e Antonino, sempre imprescindíveis, pelos momentos de descontração e pelo apoio nas horas mais difíceis.

Aos amigos James, Dasciana e Adriano pelas contribuições no decorrer deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos amigos extracurriculares.

À família GPSA, em especial, às “Bios”, aos “Gasosos”.

À família GPBIO por ter me adotado e acolhido.

Aos alunos da Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar pela recepção e pelos momentos de convívio.

À Márcia por sua importante ajuda nos experimentos.

À Karolzinha pelas análises de DRX.

À Bia pelas análises de infravermelho.

Ao Flávio pelas micrografias no MEV.

Ao Rafael pelas análises no Autosorb.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química da UFC e ao Chiquinho.

A todos que de alguma forma me ajudaram. Todas as contribuições, por menores que tenham sido, foram de grande importância para mim.

A CAPES pelo apoio financeiro.

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar”.*

Autor desconhecido

*“Talvez seja este o aprendizado mais difícil:
manter o movimento permanente,
a renovação constante,
a vida vivida como caminho e mudança.”*

Maria Helena Kuhner

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract	ii
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	vi
Capítulo 1. Introdução	1
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Enzimas	6
2.1.1. Lipases	6
2.1.2. Aplicações de lipases.....	7
2.1.3. Mecanismo de ação das lipases	9
2.1.4. Lipase de <i>Candida antarctica</i> tipo B.....	11
2.2. Imobilização de enzimas	14
2.3. Métodos de imobilização.....	15
2.3.1. Imobilização por adsorção.....	16
2.3.2 Imobilização por confinamento em matriz.....	17
2.3.3 Imobilização por ligação covalente	18
2.4. Escolha do suporte para imobilização	21

2.5. Toyopearl.....	22
2.6. Ativação.....	23
2.6. Meios reacionais em biocatálise.....	24
Capítulo 3. Materiais e Métodos	27
3.1. Materiais	27
3.1.1. Enzima.....	27
3.1.2. Suportes para imobilização.....	27
3.2. Métodos	28
3.2.1. Determinação da atividade hidrolítica da enzima solúvel.....	28
3.2.2. Determinação da concentração de proteína.....	29
3.2.3. Eletroforese.....	29
3.2.4. Purificação da enzima.....	29
3.2.5. Caracterização morfológica do suporte	30
3.2.5.1. Difração de raio-X.....	31
3.2.5.2. Microscopia eletrônica de varredura	31
3.2.5.3. Aquisição de isothermas de adsorção e dessorção	31
3.2.6. Ativação do suporte	31
3.2.6.1. Preparação do suporte glioxil	32
3.2.6.2. Preparação do suporte glutaraldeído.....	33
3.2.6.3. Preparação do suporte glioxil-glutaraldeído.....	34

3.2.6.4. Preparação do suporte glutaraldeído-glioxil.....	34
3.2.6.5. Preparação do suporte glioxil-EDA-glutaraldeído	34
3.2.7. Caracterização química do suporte.....	35
3.2.7.1. Análise de infravermelho	35
3.2.8. Imobilização da enzima ao suporte	36
3.2.9. Determinação da atividade hidrolítica do derivado.....	37
3.2.10. Cálculo dos parâmetros de imobilização.....	37
3.2.11. Determinação da atividade de síntese do derivado.....	38
3.2.12. Estudo da estabilidade operacional.....	39
3.2.13. Ensaio de estabilidade térmica.....	40
3.2.13.1. Método de ajuste exponencial não-linear	41
3.2.13.2. Método de ajuste linear.....	41
Capítulo 4. Resultados e Discussões	43
4.1. Caracterização da solução comercial de CalB.....	43
4.1.1. Atividade hidrolítica	43
4.1.2. Eletroforese.....	44
4.1.3. Purificação da enzima.....	44
4.2. Caracterização morfológica do suporte	45
4.2.1. Difração de raio-X.....	46
4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura	46

4.2.3. Determinação das propriedades texturais	47
4.3. Estudos de imobilização para os suportes ativados	49
4.4. Caracterização química dos suportes.....	51
4.5. Imobilização com alta concentração de proteína.....	62
4.6. Efeito do tempo de imobilização nas propriedades da enzima imobilizada.....	65
4.7. Ensaio de estabilidade térmica	67
4.7.1. Estabilidade térmica da enzima solúvel e enzima imobilizada	68
4.7.2. Estabilização térmica dos derivados produzidos <i>versus</i> derivado comercial	72
4.7.3. Efeito dos diferentes tempos de imobilização na estabilização térmica da enzima imobilizada.....	74
4.8. Ensaio de estabilidade operacional	77
Capítulo 5. Conclusões	81
Capítulo 6. Referências Bibliográficas.....	84

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a imobilização da lipase de *Candida antarctica* tipo B (CalB) através de ligação covalente utilizando a resina hidrofílica Toyopearl como suporte. Avaliaram-se vários protocolos de ativação, utilizando como agentes ativantes: glicidol, glutaraldeído e etilenodiamina (EDA), e seu efeito na atividade hidrolítica do biocatalisador obtido. A atividade hidrolítica dos derivados foi avaliada pela hidrólise do butirato de para-nitrofenila (PNPB) e utilizou-se como reação de esterificação, a síntese do butirato de butila, empregando ácido butírico e butanol como substratos. O suporte foi previamente caracterizado pela obtenção de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difratogramas de raio-X (DRX) e espectros de infravermelho (FTIR). A área superficial e a porosidade do suporte foram avaliadas pelo método BET. Determinaram-se a concentração de proteína e a atividade enzimática do sobrenadante antes e após os processos de imobilização. O melhor resultado de atividade hidrolítica da enzima imobilizada foi de $894,17 \pm 43,29$ U/g de suporte, utilizando o suporte Toyopearl-Glioxil-EDA-Glutaraldeído (Toyo-GEG). Este valor de atividade foi 1,56 vezes maior que o obtido para o derivado comercial Novozym 435. A influência de diferentes concentrações de proteína foi avaliada e observou-se a saturação do suporte com uma concentração de 40 mg/g e $2238,25 \pm 27,33$ U/g de atividade. A influência dos tempos de incubação na imobilização indicou que longos tempos de imobilização acarretam na diminuição da atividade hidrolítica dos biocatalisadores. Nos estudos de estabilidade térmica a 60° C, conseguiu-se um elevado grau de estabilização para o derivado, com estabilidade térmica superior a da enzima solúvel. Para o derivado obtido com 72 horas de imobilização o fator de estabilização em relação à enzima solúvel e ao derivado comercial, respectivamente, foi de 694,56 e 12,74. Quanto à estabilidade operacional, após o sétimo ciclo de síntese do butirato de butila, o derivado Toyo-GEG reteve em torno de 76 % de sua atividade inicial.

Palavras-chave: ligação covalente, glutaraldeído, etilenodiamina, estabilidade térmica e operacional

ABSTRACT

The objective of this work was to study the immobilization of *Candida antarctica* type B lipase (CalB) by covalent bond using hydrophilic resin named Toyopearl as a support. The influence of activation agents (glycidol, glutaraldehyde and ethylenediamine) in the hydrolytic activity of the biocatalyst was investigated. The enzyme preparations were tested in the hydrolysis of para-nitrophenyl butyrate (PNPB) and in an esterification reaction, butyl butyrate synthesis from butyric acid and butanol. The support was previously characterized by scanning electronic microscopy (SEM), X-ray diffraction (DRX) and Fourier transform infra red (FTIR). Superficial area and porosity were evaluated using BET method. Protein concentration and enzymatic activity in the supernatant were determined before and after immobilization process. Best results of hydrolytic activity were obtained using the enzyme immobilized in Toyopearl-Glyoxyl-EDA-Glutaraldehyde (Toyo-GEG), 894.17 ± 43.29 U/g of support, which is 1.56-fold higher than the hydrolytic activity of Novozym 435. The influence of different loadings of protein and the incubation time in the immobilization were also studied. The saturation of support was observed with a load of 40 mg/g of support with 2238.25 ± 27.33 U/g. A decrease in the hydrolytic activity of enzyme preparations was observed for long incubation times. However, thermal stability studies at 60° C, showed that this parameter was important for enzyme stabilization. Thermal stabilization by immobilization was achieved and the immobilized enzyme was more thermal stable than the soluble enzyme. The immobilized lipase prepared at incubation time of 72 hours was 694.59-fold more stable than soluble enzyme and 12.74 -fold than Novozym 435. In organic medium, cycles of synthesis of butyl butyrate was chosen to quantify operational stability. After the seventh cycle, Toyo-GEG retained around 76 % of the initial activity.

Keywords: covalent bond, glutaraldehyde, ethylenediamine, thermal and operational stability

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 2.1.** Mecanismo da reação de hidrólise de ligação éster catalisada por esterases e lipase (Jaeger *et al.*, 2004) 11
- Figura 2.2** Sítio ativo da lipase tipo B de *Candida antarctica* mostrando sua conformação aberta com **(a)** vista superior e **(b)** seção transversal (Uppenberg *et al.*, 1994)..... 13
- Figura 2.3:** Métodos de imobilização de enzimas (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004) 15
- Figura 2.4:** Os grupos amino da enzima ligam-se aos grupos aldeído presentes no suporte 19
- Figura 2.5:** Ligação do suporte a enzima pela formação de base de Schiff 20
- Figura 2.6:** Representação da resina Toyopearl mostrando os grupos funcionais reativos (amino e hidroxila), em que R é a representação de um radical hidrofílico (Tosoh Bioscience LLC) 22

Capítulo 3

- Figura 3.1:** Processo de separação de proteínas por diálise 30
- Figura 3.2:** Fluxograma de obtenção do suporte Toyopearl-Glioxil 33
- Figura 3.3:** Fluxograma de obtenção do suporte Toyopearl-Glutaraldeído 33
- Figura 3.4:** Fluxograma de obtenção do suporte Toyopearl-Glioxil-Etilenodiamina-Glutaraldeído 35

Capítulo 4

Figura 4.1: Ensaio de eletroforese para o padrão BSA (1) e para a preparação comercial de CalB (2).....	44
Figura 4.2: Difratoograma de raio-X (DRX) para o suporte Toyopearl.....	46
Figura 4.3: Imagens obtidas do suporte Toyopearl através de microscópio eletrônico de varredura (MEV), (a) com aumento de 200 vezes, (b) com aumento de 500 vezes, (c) com aumento de 2.000 vezes e (d) com aumento de 3.000 vezes....	47
Figura 4.4: Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (N ₂) para o suporte Toyopearl.....	48
Figura 4.5: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte Toyopearl antes dos processos de ativação.....	52
Figura 4.6: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-gliceril após a etapa de ativação com glicidol sem oxidação	53
Figura 4.7: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glioxil após a etapa de ativação com glicidol precedida de oxidação com NaIO ₄	54
Figura 4.8: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glutaraldeído após a etapa de ativação com glutaraldeído	55
Figura 4.9: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glioxil-glutaraldeído após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO ₄ , e com glutaraldeído	56
Figura 4.10: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glutaraldeído-gliceril após a etapa de ativação com glutaraldeído e com glicidol antes da etapa de oxidação com NaIO ₄	57
Figura 4.11: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glutaraldeído-glioxil após a etapa de ativação com glutaraldeído e com glicidol seguido de oxidação com NaIO ₄	58
Figura 4.12: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glioxil-EDA após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO ₄ , e com EDA.	60

- Figura 4.13:** Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glioxil-EDA-glutaraldeído após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO₄, e com EDA e glutaraldeído 61
- Figura 4.14:** Perfil de atividade hidrolítica para diferentes concentrações de proteína, utilizando CalB dialisada, com tempo de imobilização de 6 horas, pH 10, a 25° C 63
- Figura 4.15:** Perfis de atividade hidrolítica residual para a lipase do tipo B de *C. antarctica* na forma solúvel, nas temperaturas de 40 (■), 60 (■) e 80° C (■), inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, em banho úmido, atividade hidrolítica de PNPB (15 mM) 68
- Figura 4.16:** Perfis de atividade hidrolítica residual para o derivado Toyo-GEG, nas temperaturas de 40 (■), 60 (■) e 80° C (■), inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, em banho úmido, atividade hidrolítica de PNPB (15 mM) 69
- Figura 4.17:** Perfil de atividade hidrolítica residual para a enzima solúvel (■) e para a enzima imobilizada (■) suporte Toyo-GEG com uma concentração de proteína de 6 mg/g, 6 horas de imobilização, pH 10, 25° C, utilizando preparação comercial bruta, desativação a 60° C em tampão fosfato pH 7, atividade hidrolítica de PNPB (15 mM)..... 72
- Figura 4.18:** Atividade hidrolítica residual para os derivados Novozym 435 (■), Toyo-GEG (■) e Toyo-GG (■) os dois últimos com concentração de proteína de 6 mg/g, incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido 73
- Figura 4.19:** Perfis das perdas de atividade hidrolítica para os derivados com tempos de 6 (■), 12 (■), 24 (■) e 72 (■) horas de imobilização em pH 10 a 25° C, para o suporte Toyo-GEG, concentração de proteína de 6 mg/g, por inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido 75
- Figura 4.20:** Perfis de atividade hidrolítica residual para os derivados com tempos de 6 (■), 12 (■), 24 (■) e 72 (■) horas de imobilização em pH 10 a 25° C, para o suporte Toyo-GEG, concentração de proteína de 6 mg/g, inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido 75
- Figura 4.21:** Perfis de conversão ao longo do tempo de síntese do butirato de butila em hexano a 25° C para o derivado comercial Novozym 435 (■) e o derivado Toyo-GEG (■), utilizando ácido butírico 0,3 M e n-butanol 0,3 M, pH 5,0..... 78
- Figura 4.22:** Perfil da estabilidade operacional com relação à conversão, baseada em ciclos de síntese de butirato de butila de 24 horas em hexano a 25° C, utilizando ácido butírico 0,3 M e n-butanol 0,3 M, pH 5,0 para o derivado comercial Novozym 435 (■) e o derivado Toyo-GEG (■)..... 79

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1: Mercado global da indústria de enzimas 5

Tabela 2.2. Aplicações industriais das lipases..... 8

Capítulo 4

Tabela 4.1: Propriedades texturais para o suporte Toyopearl determinadas pelo método BET através da adsorção de N₂ a 77 K..... 48

Tabela 4.2: Parâmetros avaliados na imobilização de lipase do tipo B de *C. antarctica*, utilizando concentração de proteína de 6 mg/g, com tempo de incubação de 6 horas, pH 10, 25° C em suportes com diferentes estratégias de ativações 49

Tabela 4.3: Frequências vibracionais do suporte Toyopearl 52

Tabela 4.4: Frequências vibracionais do suporte gliceril após a etapa de ativação com glicidol sem oxidação 53

Tabela 4.5: Frequências vibracionais do suporte glioxil após a etapa de ativação com glicidol precedida de oxidação com NaIO₄ 54

Tabela 4.6: Frequências vibracionais do suporte glutaraldeído após a etapa de ativação com glutaraldeído 55

Tabela 4.7: Frequências vibracionais do suporte glioxil-glutaraldeído após a etapa de ativação com glicidol seguido de oxidação e com glutaraldeído..... 56

Tabela 4.8: Frequências vibracionais do suporte glutaraldeído-gliceril após a etapa de ativação com glutaraldeído e com glicidol antes da oxidação com NaIO₄..... 58

Tabela 4.9: Frequências vibracionais do suporte glutaraldeído-glioxil após a etapa de ativação com glutaraldeído e com glicidol seguido de oxidação com NaIO₄ 59

Tabela 4.10: Frequências vibracionais do suporte glioxil-EDA após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO ₄ , e EDA.....	60
Tabela 4.11: Frequências vibracionais do suporte ,glioxil-EDA-glutaraldeído após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO ₄ , e com EDA e glutaraldeído	61
Tabela 4.12: Avaliação de parâmetros avaliados na imobilização utilizando diferentes concentrações de proteína, utilizando o suporte Toyo-GEG, com tempo de incubação de 6 horas, pH 10, a 25° C	64
Tabela 4.13: Avaliação de parâmetros na imobilização com diferentes tempos de incubação, utilizando o suporte Toyo-GEG, com concentração de 6 mg/g (369,36 ± 5,57 U/mL) , pH 10, a 25° C	66
Tabela 4.14: Tempos de meia-vida para a enzima solúvel (ES) e para a enzima imobilizada (EI), Toyo-GEG, nas temperaturas de 40, 60 e 80° C, inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, em banho úmido (hidrólise de PNPB 15 mM)	70
Tabela 4.15: Atividade hidrolítica do derivado comercial e para os derivados obtidos a partir da imobilização da CalB utilizando concentração de proteína de 6 mg/g (369,36 ± 5,57 U/mL) , pH 10, 25° C com tempo de imobilização de 6 horas, e seus respectivos parâmetros de desativação térmica com incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido.....	74
Tabela 4.16: Atividade hidrolítica dos derivados obtidos a partir da imobilização da CalB em Toyo-GEG, utilizando concentração de proteína de 6 mg/g (369,36 ± 5,57 U/mL), pH 10, 25° C para os tempos de imobilização de 6, 12, 24 e 72 horas, e seus respectivos parâmetros de desativação térmica com incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido	76

1. INTRODUÇÃO

Inúmeros ésteres são considerados de grande importância na vida cotidiana. Produtos naturais, tais como triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem. Estes compostos atuam como precursores e/ou aditivos na obtenção de produtos agro-químicos, plastificantes e polímeros, também são largamente utilizados como aromatizantes na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (Lozano *et al.*, 2004).

Os ésteres são geralmente produzidos por rotas químicas e, a substituição desses processos químicos convencionais por processos enzimáticos torna o desenvolvimento e o aprimoramento desta tecnologia de suma importância uma vez que há um crescente interesse da indústria por produtos obtidos através de fontes naturais (Chen, 1996). Os ésteres aromatizantes, ésteres de baixo peso molecular, são amplamente utilizados em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. O mercado mundial para esses compostos está avaliado em US\$ 3 bilhões, um montante que representa aproximadamente um quarto do valor do mercado de aditivos alimentares. Além disso, quando preparados por processos enzimáticos podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural sendo, portanto, preferidos pelo mercado consumidor.

A obtenção de ésteres pode ser efetuada por rotas de síntese empregando catalisador químico ou bioquímico. Através da via enzimática, grandes melhorias do processo podem ser obtidas, principalmente em relação à redução de custos operacionais (mão-de-obra, tempo de reação e gasto de energia). Por esta razão, é cada vez mais crescente o interesse da aplicação de biocatalisadores em síntese orgânica (Cao *et al.* 1999).

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas que têm como substrato natural triglicerídeos, podendo também catalisar a hidrólise de uma variedade de compostos contendo misturas de ésteres de ácidos carboxílicos. Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para efetuar reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados (Jaeger e Reetz, 1998).

Aproximadamente 50 ésteres, formadores de aromas, foram sintetizados por reações catalisadas por lipases (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Em princípio, o processo pode ser realizado em meios reacionais contendo mistura de álcool e ácido carboxílico

em presença ou ausência de solventes, resultando em elevada produtividade e altos rendimentos.

Essas enzimas têm se tornado bastante atrativas devido a sua capacidade de catalisar a síntese de diferentes ésteres de interesse industrial e por possuírem alta estabilidade em solventes orgânicos. Além disso, não necessitam da presença de cofatores (Jaeger e Reetz, 1998 e Chen, 1996).

Para que a biotransformação possa competir com a produção química otimizada, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados. As enzimas na forma solúvel são, normalmente, menos estáveis que os catalisadores químicos e não podem ser usadas em condições severas, pela possível desnaturação e conseqüente perda de atividade. Quando estocadas ou durante o uso, estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos (Svendsen *et al.*, 1997). Assim, as lipases imobilizadas estão se tornando cada vez mais úteis para os processamentos biotecnológicos. A imobilização assegura o aumento da concentração de biocatalisador por volume de reator, o reuso das enzimas e minimiza o custo de separação dos produtos, desta forma superando o inconveniente econômico associado ao seu uso. A imobilização também fornece flexibilidade operacional e melhora a estabilidade térmica e química das enzimas (Balcão *et al.*, 1996).

Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo (Chen, 1996). O uso de biocatalisadores imobilizados é crescente em escala industrial, especialmente na indústria farmacêutica, de detergentes, couros e panificação (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

Há uma vasta quantidade de trabalhos na literatura que tratam dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meios aquosos e não aquosos. Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, foram estudados para a imobilização de lipases (Fernández-Lafuente *et al.*, 1993, Jaeger e Eggert, 2002, Dalla-Vechia *et al.*, 2004 e Rodrigues *et al.*, 2007).

Estudos comparativos mostram diferenças acentuadas no desempenho de lipases imobilizadas nos vários suportes, e evidenciam que apesar das várias experiências reportadas na literatura, a imobilização de lipases ainda é um desafio complexo, uma vez que a extensão da imobilização depende da estrutura da enzima, método de imobilização, e do tipo de suporte (Balcão *et al.*, 1996 e Villeneuve, 2000). Em muitos

casos, suportes que proporcionam uma elevada atividade e estabilidade da enzima apresentam sérias limitações de resistência mecânica e de queda de fluxo do substrato, que os tornam inviáveis para a utilização em alguns tipos de reatores.

Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo principal o desenvolvimento de um biocatalisador com propriedades adequadas para utilização em um reator enzimático para a produção de um éster aromatizante, butirato de butila, em condições microaquosas. O butirato de butila contribui para a formação do aroma natural de frutas como o abacaxi e a banana e é largamente utilizado na indústria de alimentos (Chen, 1996). A enzima utilizada neste estudo foi a preparação comercial de lipase tipo B de *Candida antarctica* (CalB). Como suporte para imobilização, foi escolhido a resina Toyopearl, baseando-se nas suas propriedades químicas, texturais e de resistência mecânica, para o qual foram abordadas várias estratégias de ativação. O biocatalisador foi obtido via imobilização por ligação covalente. Todos os derivados foram avaliados quanto à sua atividade catalítica. Para aqueles que obtiveram os melhores resultados foi realizado um estudo dos parâmetros de estabilidade térmica e operacional, visando melhorar o desempenho comercial destes biocatalisadores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enzimas

As enzimas desempenham a função de catalisar as reações nos organismos. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas. Elas atuam diminuindo a energia de ativação necessária para que se atinja um estado de transição e ocorra reação química, acarretando o aumento da velocidade de uma reação por um fator de 10^5 a 10^{17} vezes comparado a uma reação não catalisada. Isto ocorre devido os grupos funcionais catalíticos da enzima formar uma ligação covalente transitória com o substrato e ativá-lo para a reação, ou um grupo pode ser transferido transitoriamente do substrato para a enzima, fornecendo uma alternativa de caminho para a reação de energia menor. Desta forma, os sítios ativos são complementares não ao substrato em si, mas aos estados de transição por meio dos quais os substratos passam quando são convertidos aos produtos durante uma reação enzimática. Grande parte do poder catalítico das enzimas é derivado da energia livre liberada na formação de muitas ligações e interações fracas enzima-substrato, essa energia contribui para a especificidade, bem como para a catálise, essas interações são otimizadas no estado de transição da reação. (Lehninger *et al.*, 2006).

As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos. Entretanto, quando a permeabilidade da membrana celular é insuficiente para a passagem do substrato ou quando ocorrem reações laterais indesejáveis, é necessário conduzir a biotransformação com enzimas isoladas ou purificadas. Atualmente, mais de 3.000 diferentes enzimas têm sido identificadas e muitas isoladas em sua forma pura (Jaeger *et al.*, 1994 e Dalla-Vechia *et al.*, 2004). Várias têm sido obtidas na forma cristalina e a seqüência de aminoácidos, bem como a estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios-X e RMN-2D (Uppenberg *et al.*, 1994).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, especialmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não-convencionais, o que ampliou consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (Svendsen *et al.*, 1997). Com um mercado crescente e promissor, a maior parte da produção de enzimas ainda é

destinada às indústrias de detergente e amido. Num estudo realizado por Castro *et al.*, (2004) o mercado mundial de enzimas foi estimado em cerca de US\$ 1.355 milhões por ano, conforme dados apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Mercado global da indústria de enzimas.

Setor	Enzimas	Milhões de dólares (US\$)
Alimentos fermentados, cervejaria, edulcorantes, panificação, etanol de cereais	α -amilase, glucoamilase, glucose isomerase	500
Detergentes	Protease, lipase, amilase	450
Têxteis	Amilases	150
Tratamento de couro	Enzimas diversas	25
Têxteis, produtos alimentícios	Celulases	25
Produtos lácteos	Lactase	150
Alimentício, cervejaria, panificação, terapêutico	Papaína	25
Suco de frutas, vinícola	Pectinases, pectina-esterases	30
Total		1.355

Fonte: Castro *et al.*, 2004.

Enzimas isoladas ou purificadas possuem várias propriedades que as tornam atrativas para a biotransformação. Elas têm se tornado objeto de muitas investigações devido à alta atividade catalítica e seletividade em comparação com os catalisadores convencionais, e ao fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais suaves (Castro *et al.*, 1995 e Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

A utilização de enzimas como catalisadores em reações sintéticas em meio orgânico não é recente; as primeiras são do início do século XX. Entretanto, o interesse por estes sistemas ressurgiu após a publicação dos trabalhos de Zaks e Klibanov (1985) e (1988), nos anos 80. As enzimas apresentavam pouca utilidade em síntese orgânica devido, principalmente, à idéia pré-concebida de que somente o meio aquoso era propício para manter a conformação estrutural cataliticamente ativa. Entretanto, sabe-se atualmente que muitas enzimas (ou complexos enzimáticos) são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em soluções aquosas, ou em certos casos até superior. Algumas enzimas podem apresentar uma maior rigidez em meio orgânico. Esta característica deve-se, em parte, ao aumento das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos e à baixa constante dielétrica da maioria deles e, também, ao aumento do número de

ligações de hidrogênio intramoleculares, conferindo maior rigidez à molécula de enzima.

2.1.1. Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC. 3.1.1.3) são enzimas classificadas como carboxil esterases, catalisam a hidrólise e a síntese de acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia maior ou igual a dez átomos de carbono, sendo o trioleoilglicerol o substrato padrão (Jaeger *et al.*, 1999 e Jaeger e Eggert, 2002). A maioria das lipases é caracterizada por atuar em interfaces orgânico-aquosas, onde os mecanismos da catálise dependem da organização dos lipídios na interface (Dalla-Vechia *et al.*, 2004). A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está na ocorrência do fenômeno interfacial. As lipases possuem maior atividade em substratos insolúveis, tipicamente triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa com mais de 10 átomos de carbono, enquanto as esterases atuam em substratos solúveis, principalmente ésteres simples, tais como o acetato de etila, e triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia curta com menos de 6 carbonos. As esterases obedecem à cinética de Michelis-Mentem enquanto as lipases necessitam de uma mínima concentração de substrato para que atividades elevadas sejam obtidas (Silva e Amorim, 1999 e Palomo *et al.*, 2003).

Amplamente distribuídas na natureza, as lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais com os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, as leveduras *Tulopsis* sp e *Candida* sp e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases provenientes de microrganismos são preferíveis às de fontes animais e plantas, devido ao seu alto custo de isolamento (Dumitriu *et al.*, 2003 e Castro *et al.*, 2004).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando de 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. Seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 e 7,6, sendo que a maioria delas possui pI entre 4 e 5. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na

faixa de temperatura entre 30 e 40 °C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (Kirk e Christensen, 2002 e Sharma *et al.*, 2001).

Estas enzimas são os mais versáteis e os mais eficientes biocatalisadores empregados devido sua alta atividade e estabilidade em condições microaquosas (Chulalaknasanukul *et al.*, 1990, Zaks e Klibanov, 1988 e Yadav e Lathi, 2003). Além da versatilidade, as lipases são biodegradáveis, quimio-seletivas, régio-específicas e apresentam baixa toxicidade permitindo a obtenção de produtos com elevado grau de pureza sem causar fortes impactos ambientais (Jaeger e Eggert, 2002).

2.1.2. Aplicações de lipases

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. Além de catalisar a quebra das ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (Balcão *et al.*, 1996).

Outros compostos, além de água e álcool, podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem participar de reações como aminólises, tiotransesterificações e oximólises, em solventes orgânicos, com elevada seletividade. O uso deste biocatalisador em aminólise de ésteres, em meios anidros, tem sido bem sucedido na síntese de peptídeos e amidas de ácidos graxos. Esses resultados são promissores para a utilização de tecnologia de lipases em síntese de peptídeos opticamente ativos, polímeros, surfactantes e novos detergentes com baixo custo. A atividade hidrolítica da lipase pode ser diretamente relacionada com sua atividade de síntese, mas é independente de sua atividade de interesterificação. Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (Castro *et al.*, 2004).

As lipases vêm conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais, principalmente nos setores químicos e alimentícios, as principais aplicações são mostradas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Aplicações industriais das lipases.

Setor	Efeito Utilizado	Produto
Alimentício		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhoramento do sabor/qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas, ex: saquê, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais Hidrólise de óleos (ácidos graxos), diglicerídeos e monoglicerídeos)	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
Químico		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes

Fontes: Sharma *et al.*, 2001 e Castro *et al.*, 2004.

2.1.3. Mecanismo de ação das lipases

Em seu ambiente natural as lipases em geral são ativadas por uma interface lipídio-água onde a fase apolar é formada pelos próprios substratos (Sarda e Desnuele, 1958). A diferença mais importante entre as “verdadeiras” lipases e outras hidrolases, como as esterases, são as interações físico-químicas com seus substratos. Em contraste com as esterases, que apresentam atividade de Michaelis-Menten normal, ou seja, a atividade da esterase aumenta conforme a concentração do substrato aumenta, até um limite por saturação, as lipases não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade da lipase. A razão pela qual uma lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (a concentração micelar crítica, CMC), porém somente em concentração acima desta, é chamada de ativação interfacial. Esse fenômeno mais conhecido originado de estudos cinéticos recentes de reações lipolíticas, relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, que formam emulsão. Lipases, diferentemente das esterases, são definidas como carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados. O mecanismo de ativação interfacial está associado a mudanças conformacionais na enzima (Silva e Amorim, 1999 e Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

A determinação da estrutura tridimensional da lipase fornece uma explicação elegante para a ativação interfacial. O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (Jaeger *et al.*, 1994 e Palomo *et al.*, 2003).

O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas e é frequentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores para a caracterização de lipases. Mais recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que algumas lipases

que apresentam a “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial, como se estivessem numa conformação sempre aberta. Por outro lado, a lipase B de *Candida antarctica*, a lipase de cobaia e as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “tampa” e não precisam da interface para exercer a atividade hidrolítica (Jaeger e Reetz, 1998 e Martinelle *et al.*, 1995).

O mecanismo da reação de hidrólise de ligação éster catalisada por esterases e lipase pode ser observado na Figura 2.1. A hidrólise do substrato inicia-se com o ataque nucleofílico pelo oxigênio da hidroxila da serina no átomo de carbono suscetível da ligação éster, levando à formação de um intermediário tetraédrico estabilizado pelas ligações do hidrogênio a átomos de nitrogênio de resíduos da cadeia principal pertencente à cavidade de oxiânion. Um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado com a liberação dos ácidos graxos e regeneração da enzima. Os substratos e os estados de transição gerados durante o processo catalítico deverão ser ligados por interações múltiplas não-covalentes com a superfície da enzima. Conseqüentemente, a força de todas estas interações será fortemente dependente da distância e dos ângulos de interação da enzima com o substrato, resultando na formação de um sítio de ligação altamente seletivo (Balcão *et al.*, 1996).

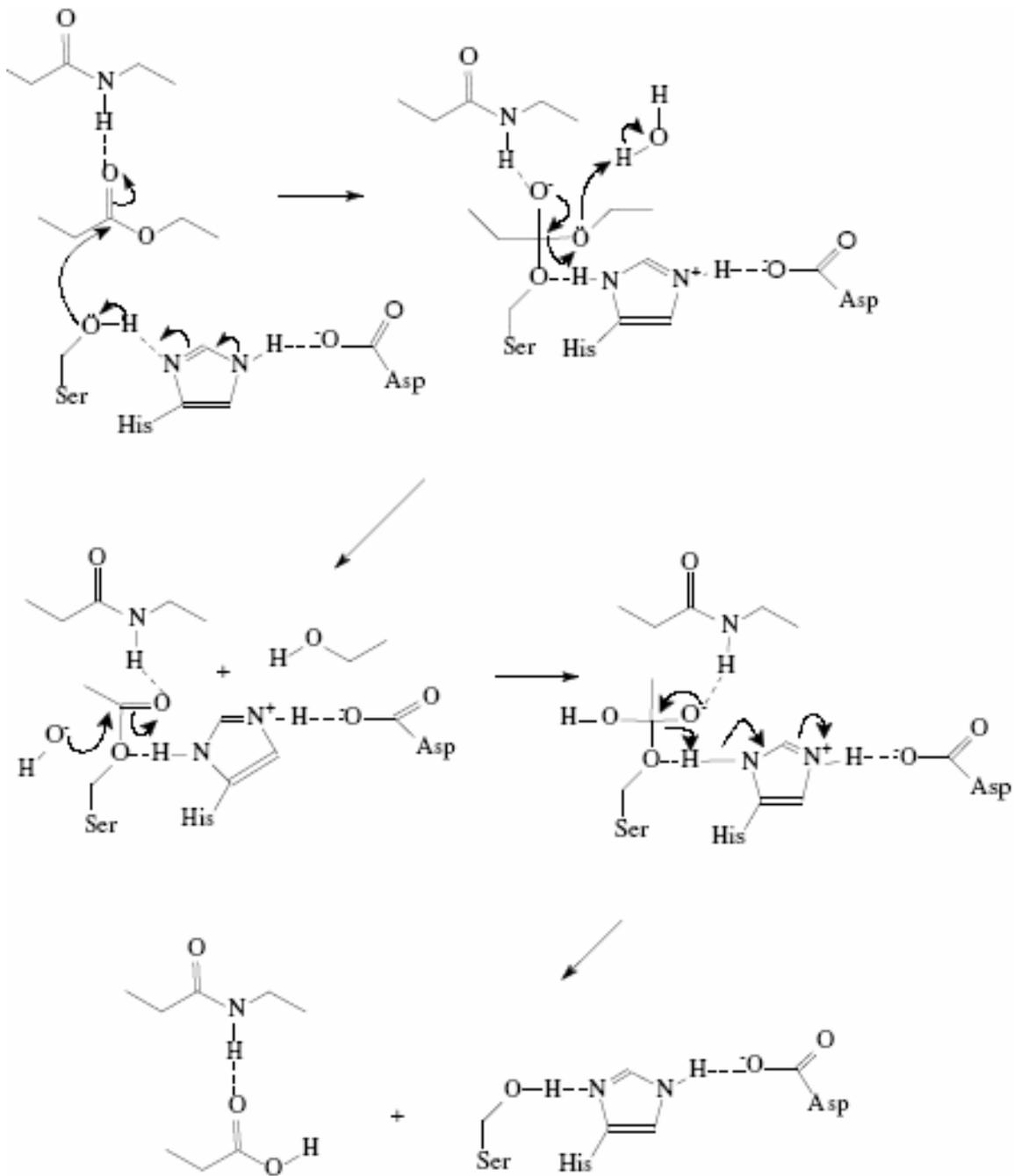


Figura 2.1. Mecanismo da reação de hidrólise de ligação éster catalisada por esterases e lipases (Jaeger *et al.*, 2004).

2.1.4. Lipase de *Candida antarctica* tipo B

A enzima utilizada neste estudo foi a lipase tipo B de *Candida antarctica* (CalB), que possui estrutura globular, é constituída de 317 resíduos de aminoácidos, tem dimensões de 30 Å × 40 Å × 50 Å, massa molecular (MM) de 33 kDa e ponto

isoelétrico (pI) de 6,0. O pH ótimo desta enzima é 7,0, embora ela permaneça estável em uma ampla faixa de pH alcalino (7,0 a 10,0). Com relação à temperatura, mesmo a CalB não sendo tão estável na forma solúvel, na forma imobilizada esta enzima apresenta elevada estabilidade, podendo ser utilizada em altas temperaturas por várias horas sem perdas significativas na sua atividade (Uppenberg *et al.*, 1994, Kirk e Christensen, 2002).

A CalB é um biocatalisador com uso bem diversificado e tem sido alvo de diversos estudos, pois exibe elevada régio-seletividade e enantioseletividade com relação às demais lipases. Na forma imobilizada opera em uma ampla faixa de condições experimentais, existem vários trabalhos mostrando alta eficiência na catálise de várias reações em meio orgânico tanto em escala de laboratório quanto para uso comercial (Costa e Amorim, 1999).

Esta enzima não apresenta o fenômeno de ativação interfacial, responsável pela hiperativação característica de outras lipases, e apresenta grande afinidade por ésteres de cadeia curta (Martinelle *et al.*, 1995). Exibe atividade não específica para triglicerídeos, mesmo em elevadas temperaturas, mas apresenta elevada estereoespecificidade, tanto em hidrólise, como em síntese orgânica, provavelmente devido à presença de um limitado espaço disponível no bolso hidrofóbico do sítio-ativo. Por esse motivo possui alto grau de seletividade, sendo também potencialmente importante em síntese de glicolipídeos (Uppenberg *et al.*, 1994 e Palomo *et al.*, 2003).

Alguns autores (Martinelle *et al.*, 1995, Palomo *et al.*, 2002 e Kirk e Christensen, 2002) observaram que na estrutura da CalB, o sítio ativo está acessível ao solvente através de um canal tortuoso, medindo aproximadamente $10 \text{ \AA} \times 4 \text{ \AA}$ de área e 12 \AA de profundidade, sendo suas paredes bastante hidrofóbicas e formadas por resíduos alifáticos alinhados (Figura 2.2).

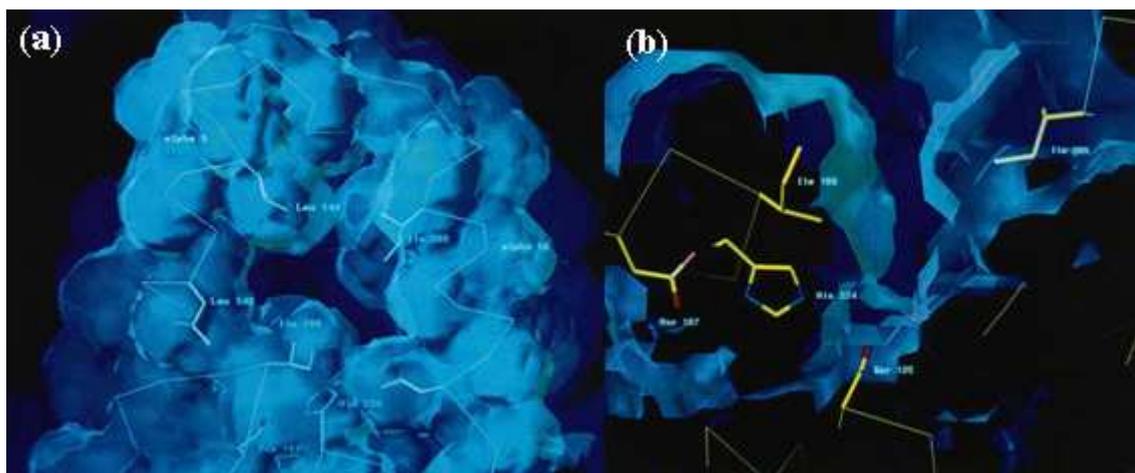


Figura 2.2. Sítio ativo da lipase tipo B de *Candida antarctica* com (a) vista superior e (b) seção transversal (Uppenberg *et al.*, 1994).

A sequência e a estrutura cristalina da CalB foi previamente determinada por Uppenberg *et al.* (1994), inicialmente foi proposto que uma pequena hélice $\alpha 5$ presente na estrutura poderia atuar como uma tampa devido a observação de estruturas cristalinas em desordem, indicando uma possível região de alta mobilidade.

Os resultados obtidos por Martinelle *et al.* (1995) mostraram que a CalB não apresenta o fenômeno de ativação interfacial, embora esse comportamento seja mais comum para esterases, ela deve ser classificada como lipase pois mostra atividade máxima tanto em interfaces lipídeo/água como para substratos no estado monomérico. Com base nessas informações, foi concluído que a hélice $\alpha 5$ não está envolvida em nenhuma mudança conformacional que pudesse controlar o acesso ao sítio ativo, ao invés disso, essa hélice móvel pode ser considerada como parte de uma ligação à interface lipídica, “ancorando” a lipase à interface.

O fator limitante para a atual aplicação industrial de CalB é, provavelmente, o preço relativamente elevado dos derivados comerciais disponíveis no mercado (o valor da Novozyme 435 é de £ 500 por kg, equivalente a R\$ 1.613,15) embora alguns processos que necessitem de elevado pureza e desempenho façam uso destes biocatalisadores. Faz-se necessário a produção de derivados com desempenho compatível a preços mais acessíveis, para a extensão da aplicação na produção de ésteres de interesse comercial.

2.2. Imobilização de enzimas

As enzimas solúveis, devido a sua natureza protéica, são menos estáveis que os catalisadores químicos e não podem ser usadas em condições severas, pela possível desnaturação e conseqüente perda progressiva da atividade funcional. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação (Zaks e Klibanov, 1988 e Chulalaknasanukul *et al.*, 1990). O custo elevado das enzimas solúveis, também, limita severamente seu uso para finalidades comerciais, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil (Lozano *et al.*, 2004b e Svendsen *et al.*, 1997).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma solúvel. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Soares *et al.*, 2002).

Novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização. A utilização destas técnicas tem sido crescente nos últimos vinte anos e, com isso, novas informações teóricas e aplicações práticas estão surgindo. O uso de biocatalisadores imobilizados também é crescente em escala industrial, especialmente na indústria farmacêutica, de detergentes, couros e panificação, entre outras (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

Assim, as lipases imobilizadas estão tornando-se cada vez mais úteis para os processamentos biotecnológicos. A imobilização assegura o reuso das enzimas, pois permite a remoção da enzima do meio reacional, e minimiza o custo de separação dos produtos, desta forma superando o inconveniente econômico associado ao seu uso. A imobilização também fornece a flexibilidade operacional devido à melhora das estabilidades térmica e química das enzimas através da estabilização da estrutura terciária da proteína (Balcão *et al.*, 1996 e Villeneuve, 2000).

2.3. Métodos de imobilização

Nos últimos anos, com o intuito de contornar os possíveis problemas de instabilidade e, assim, otimizar as várias aplicações dos biocatalisadores, foram apresentados na literatura vários procedimentos de imobilização (Fernández-Lafuente *et al.*, 1993, Jaeger e Eggert, 2002, Dalla-Vecchia *et al.*, 2004 e Rodrigues *et al.*, 2007), sendo que estes processos envolvem diferentes graus de complexidade e eficiência.

Os processos de imobilização requerem uma interação fraca ou a formação de ligações covalentes entre a lipase e o suporte. Os métodos de imobilização mais utilizados fazem uso de adsorção ou ligação covalente da enzima a um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento em membrana polimérica em micelas reversas (Villeneuve, 2000), ver Figura 2.2.

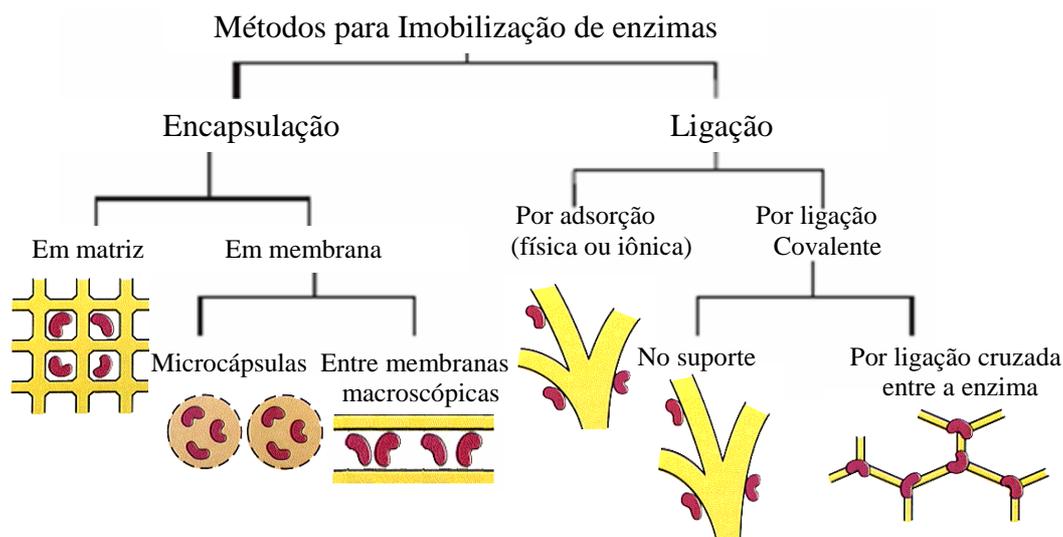


Figura 2.3: Métodos de imobilização de enzimas (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Um dos fatores que sempre deve ser considerado na utilização de um determinado sistema de imobilização é o tipo de interação entre o suporte e o biocatalisador, que pode influenciar diretamente na estabilidade e nos efeitos cinéticos da catálise (Villeneuve, 2000 e Zaks e Klivanov, 1988 e 1985).

A princípio, todos os métodos existentes para imobilização podem ser empregados para lipases, dando-se preferência à utilização daqueles que apresentem uma alta retenção de atividade. Para uma produção em grande escala diversos fatores

devem ser levados em conta para escolha do processo de imobilização a ser utilizado: a metodologia deve ser reprodutiva, o processo não deve ser muito demorado (oneroso), o método deve conferir alta estabilização da enzima e obtenção de um derivado com elevada atividade.

2.3.1. Imobilização por adsorção

O método mais fácil de preparar uma enzima imobilizada está baseado na adsorção física das moléculas desta sobre a superfície de matrizes sólidas. O método consiste em colocar em contato a solução aquosa da enzima e o suporte. Entre todos os métodos, o de adsorção é o mais utilizado para lipases devido a facilidades no preparo, na recuperação do suporte e ao baixo custo relativo. Este método tem sido muito útil em sistemas não aquosos, em que a dessorção consegue ser evitada devido à baixa solubilidade da enzima nos solventes hidrofóbicos (Balcão *et al.*, 2006).

A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (Villeneuve, 2000).

Os materiais utilizados como suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos sendo que os mais comuns são a sílica, alumina, carvão ativado, e vários polissacarídeos, além de polímeros que podem ser naturais, como agar, ou sintéticos. Balcão *et al.*, em 1996, publicaram uma compilação de métodos de imobilização, mostrando que vários materiais podem ser utilizados, tais como polietileno, polipropileno, celite, resina sintética, celulose, sefadex, entre outros.

O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação. Este processo, em geral, é realizado à temperatura constante e isotermas de adsorção são obtidas, as quais seguem as equações de Langmuir ou Freundlich (Rodrigues, 2005).

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, depende de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros (Villeneuve, 2000).

A superfície do suporte, para imobilização de lipases por adsorção, pode ser modificada química ou fisicamente utilizando diferentes moléculas que conferem caráter hidrofóbico ao suporte resultante. Recentemente, um método de modificação da superfície do suporte empregando adsorção de hidrofobinas, pequenas proteínas secretadas por fungos filamentosos, foi desenvolvido. As hidrofobinas agem como partículas hidrofóbicas ativantes da lipase, conferindo a estas, propriedades similares às lipases adsorvidas em suportes convencionais (Guisán *et al.*, 2001 e Palomo *et al.*, 2003).

Estudos realizados para a imobilização de lipase de *C. cylindracea* por adsorção em zeólita Y (Knezevic *et al.*, 1998) e lipase de *C. cylindracea* e de *C. rugosa* por adsorção em óxido de nióbio (Castro *et al.*, 2000) apresentaram grandes perdas de atividade, ambos, para a hidrólise de óleo de palma. Castro *et al.*, (2000) conseguiram reter, após cinco ciclos, apenas 25 % da atividade inicial enquanto Knezevic *et al.*, (1998), após sete ciclos, reteve apenas 10 %.

2.3.2 Imobilização por confinamento em matriz

Duas das técnicas de imobilização mais utilizadas são, provavelmente, as de inclusão ou microencapsulação em polímeros insolúveis (formando filmes), ou em microcápsulas. A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem com velocidade maior (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a

transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (Villeneuve, 2000).

O uso de agentes gelificantes naturais, como gelatina, agarose e k-carragenas, tem sido testado para a formação de organo-gel de microemulsão, bem como hidrogéis (sem surfactante e óleo). O procedimento mais comum utilizado para a encapsulação envolve a união de dois ou mais polímeros, em especial polissacarídeos, como alginatos e carragenas que são encontrados em algas marinhas. Estes formam géis em contato com cloreto de cálcio e potássio e são muito utilizados para inclusão de proteínas (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Yadav e Jadhav (2005) imobilizaram várias lipases, tipo B de *C. antarctica* (CalB), *Pseudomonas cepacia* (PSL), *C. rugosa* (CRL) e lipase do pâncreas de porco (PPL), em sílica hexagonal mesoporosa (SHM) por adsorção e por encapsulação em matriz de alginato de cálcio. Para a imobilização com CalB, após 4 ciclos de reação de transesterificação em dioxano, a enzima reteve cerca de 96 % de sua atividade.

2.3.3 Imobilização por ligação covalente

A utilização de proteínas modificadas quimicamente teve início no final da década de 50, sendo que a técnica foi originalmente desenvolvida para auxiliar na elucidação da estrutura de proteínas. Desde o final da década de 70, muitos trabalhos de modificação de proteínas para uso em síntese têm sido apresentados com o objetivo de alterar e melhorar as propriedades da lipase nativa (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

A enzima é retida no suporte através da ligação covalente entre os grupos funcionais reativos do suporte e os grupos terminais da enzima. O procedimento envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido, através da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, pela fixação da enzima em matriz por ligação covalente ou pela formação de ligações cruzadas numa matriz, contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais (Guisán, 1988, Fernández-Lafuente *et al.*, 1993 e Córdias, 1996).

A maioria das enzimas apresenta alguns resíduos lisina os quais, geralmente, não estão envolvidos no sítio ativo da enzima. A ligação enzima-suporte deve ser feita entre os grupos amino terminais (ou grupos lisina residuais) devido sua reatividade. Os grupos amino são polares e ficam expostos na superfície da proteína e, quando desprotonados, tornam-se muito reativos, atuando como agentes nucleofílicos contra os átomos com carga parcial positiva presentes na superfície do suporte (Fernández-Lafuente *et al.*, 1993).

Em pH neutro, a reatividade dos grupos lisina da enzima é muito baixa por causa do seu pKa (em torno de 10). Com valores de pH em torno de 7 a ligação covalente da enzima ao suporte é feita de maneira unipontual. Em pH 10, o ataque multipontual se torna possível devido o aumento da reatividade destes resíduos lisina e, conseqüentemente, um número maior de bases de Schiff é formado (Mateo *et al.*, 2000 e Blanco *et al.*, 1989).

A formação de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte o que provoca mudanças conformacionais e, conseqüentemente, deformações no sítio ativo da enzima. Imobilizações em pH 10 favorecem a ocorrência de ligações multipontuais e quanto maior o tempo de incubação a tendência é ocorrerem cada vez mais interações (Mateo *et al.*, 2007). Este valor de pH é necessário para que os grupos aminos estejam desprotonados e conseqüentemente mais reativos favorecendo a formação das bases de Schiff entre a enzima e suporte, em condições alcalinas as proteínas tornam-se mais hidrofílicas (Guisán, 1988). Desta forma, os grupos amino terminais da enzima ligam-se aos grupos aldeído presentes no suporte (Figura 2.3), previamente ativado.

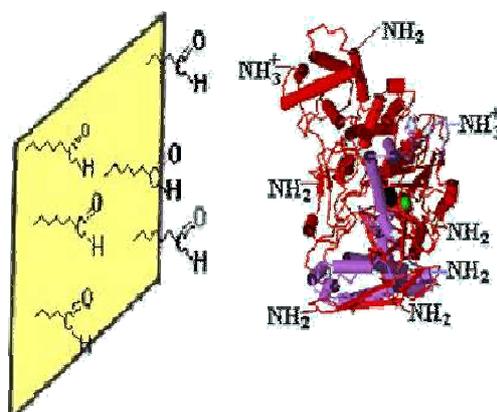


Figura 2.4: Os grupos amino da enzima ligam-se aos grupos aldeído presentes no suporte.

A partir desta reação são formadas bases de Schiff (Figura 2.4) entre a enzima e o suporte (Pedroche *et al.*, 2006).

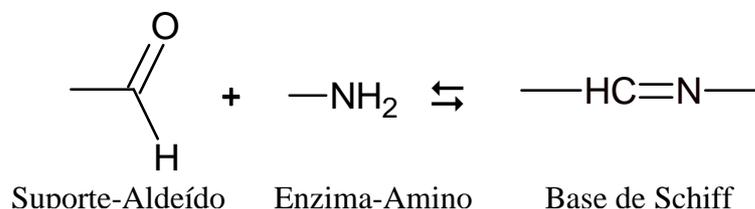


Figura 2.5: Ligação do suporte a enzima pela formação de base de Schiff.

Quando a enzima faz ligações multipontuais ao suporte ao invés de realizar ligação unipontual isto confere à lipase uma maior estabilização, provavelmente, a ligação multipontual ao suporte mantém a enzima em sua forma mais estável mesmo quando submetida a condições adversas de temperatura durante longos períodos de exposição. A forte interação entre a enzima e o suporte, obtida neste processo, pode tornar a molécula enzimática mais rígida e, conseqüentemente, menos sensível aos efeitos do meio, embora isso acarrete perdas significativas nas atividades dos derivados (Palomo *et al.*, 2003 e Tardioli *et al.*, 2003).

Na literatura (Pedroche *et al.*, 2006), há relatos da relação direta do aumento das ligações da enzima ao suporte com o acréscimo na estabilidade térmica e operacional dos derivados obtidos, embora os processos de imobilização que envolva ligações múltiplas resultem em atividades relativamente menores.

Palomo *et al.* (1996) imobilizaram a lipase de *Mucor miehei* (LMM) em diferentes resinas epoxi funcionalizadas com diferentes grupos (epoxi-iminodiacético-Sepabeads, IDA, epoxi-etilenodiamina-Sepabeads, EDA, e quelatos epóxi-cobre-Sepabeads, IDA-Cu²⁺) e adsorvida via ativação interfacial em suporte octadecil-Sepabeads. A enzima imobilizada nos diversos suportes foi utilizada na resolução do ácido (R,S)-2-butiril-2-fenilacético, em diferentes condições de temperatura e pH. As propriedades catalíticas, atividade, especificidade e enantiosseletividade foram dependentes do tipo de suporte utilizado.

Trabalhos recentes (Rodrigues, 2005 e Silva, 2007) têm utilizado método de ligação covalente para a imobilização de CalB, em suportes com grupos funcionais amino e hidroxila.

2.4. Escolha do suporte para imobilização

As propriedades catalíticas de lipases são fortemente influenciadas pelas características do suporte. A escolha do suporte para imobilização de enzimas depende de várias características que são importantes na sua aplicação em processos industriais, tais como: resistência mecânica e microbiana, estabilidade térmica, funcionalidade química, caráter hidrofóbico ou hidrofílico, facilidade de regeneração, morfologia (superfície de contato e porosidade) e custo (Villeneuve, 2000).

Em geral, os suportes utilizados nos processos de imobilização devem possuir uma grande área superficial (superfície macroscópica e área das paredes internas dos poros) para obtenção de alta capacidade catalítica e, e ainda, distribuição de poros homogênea, com tamanho de poro adequado para o acesso da enzima e aos substratos e produtos. A enzima imobilizada no interior dos poros está protegida contra a formação de agregados no processo de imobilização e contra a inativação ocasionada por agentes externos (turbulência do meio, temperatura, força iônica, solvente), permitindo obter derivados com maior estabilidade operacional (Mateo *et al.*, 2007).

É desejável que o suporte possua características compatíveis com as moléculas da enzima para prevenir a formação de ligações não-específicas (Tardioli *et al.*, 2003). Deve possuir grande densidade de grupos funcionais que possam ser facilmente substituídos por grupos reativos para possibilitar a imobilização. O suporte deve ser estável a uma ampla faixa de pH, em solução salina, deve resistir a solventes orgânicos e reagentes utilizados no processo de ativação, e às condições reacionais. Deve ser fisicamente estável, desejável certa rigidez mecânica e, principalmente, baixo custo de preparação para aumentar a viabilidade de aplicação industrial. Dificilmente encontra-se um suporte que atenda a todos estes requisitos, deste modo, a sua escolha deve levar em conta a finalidade.

Os compostos cristalinos têm uma rede organizada, com menor número de interstícios e superfície mais uniforme, o que pode reduzir, neste caso, a imobilização de enzimas ao suporte. A utilização de materiais amorfos é a mais recomendada para esta finalidade (Yadav e Jadhav, 2005).

Os materiais macroporosos têm sido bastante utilizados como suportes para a imobilização de enzimas. Estes materiais possuem estruturas complexas e oferecem uma grande área superficial, que permitirá interações proteína-superfície planas, ideais para estabelecer ligações em vários pontos, já que os processos de imobilização são

fortemente afetados por impedimentos estéricos. Outra vantagem destes suportes é a existência de poros de tamanhos regulares, que são grandes o suficiente para serem usados nos processos de imobilização (Yadav e Jadhav, 2005).

2.5. Toyopearl

As resinas Toyopearl são macroporosas e hidrofílicas e são utilizadas como recheio de colunas cromatográficas em bioprocessos (para processos em escala cromatográfica). Estas resinas são semi-rígidas, têm formato esférico e são sintetizadas através da copolimerização do etileno-glicol e polímeros do tipo metacrilatos. O alto grau de ligações cruzadas presentes em sua estrutura lhe confere resistência química. Elas possuem elevada resistência em solventes orgânicos, além de não sofrerem degradação por microrganismos. Apresenta estabilidade na faixa de pH de 2 a 13, sendo bastante resistente ao ataque ácido e básico. Autoclavável em água até 120° C. Essas características contribuem para esses materiais serem amplamente utilizados para o empacotamento de colunas para processos cromatográficos industriais, pois sua elevada rigidez permite o uso de altas taxas de fluxo. (Tosoh Bioscience LLC).

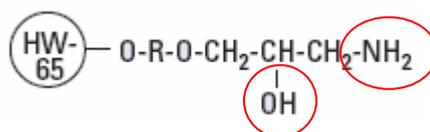


Figura 2.6: Representação da resina Toyopearl mostrando os grupos funcionais reativos (amino e hidroxila), em que R é a representação de um radical hidrofílico (Tosoh Bioscience LLC).

A resina Toyopearl AF Amino 650 pode estabelecer ligações tanto com seus grupos carboxilatos (formação de ligação peptídica) ou grupos amino (aminação seguida de redução) (Tosoh Bioscience LLC). Os grupos aldeído podem ser inseridos na resina através de agentes ativantes seguido ou não de oxidação por periodato sob condições suaves.

Sasaki *et al.*, (1985) utilizaram Toyopearl para a imobilização de urease para utilização em reator de leito fixo, obtendo valores de alta atividade catalítica durante 21 dias operando a 37°C. Fernández-Lafuente *et al.* (1999) fizeram estudos de imobilização covalente de proteínas multiméricas, obtidas a partir de extrato protéico produzido por *Escherichia coli*, utilizando Toyopearl e Sepabeads preparado com glicidol, etilenodiamina e glutaraldeído, obtendo um maior número de proteínas multiméricas ligadas covalentemente ao Sepabeads do que para o Toyopearl.

2.6. Ativação

Para que a enzima estabeleça uma ligação covalente com o suporte se faz necessária a presença de grupos funcionais que se efetue o enlace com os grupos terminais reativos da enzima. Nem sempre os grupos funcionais presentes nos suportes atendem essas características, quando isso não acontece faz-se necessário a ativação do suporte, que consiste na substituição dos grupos funcionais por grupos mais reativos ou/e no aumento da densidade desses grupos no suporte. Após a ativação do suporte por resíduos químicos mais reativos, a enzima é ligada através desses grupos por ligação covalente (Mateo *et al.*, 2000 e Blanco *et al.*, 1989).

O método de ativação mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeído ligeiramente afastados do suporte de modo evitar impedimento estérico. A principal vantagem da utilização de grupos aldeído na funcionalização do suporte é a reversibilidade da ligação amino-aldeído (enzima-suporte), que facilita a imobilização da enzima sem causar importantes distorções na estrutura protéica. A reação de oxidação dos grupos gliceril com periodato de sódio e a reação com glutaraldeído tem a finalidade de incorporar terminações aldeídicas ao suporte deixando-o pronto para reagir com a enzima (Ferreira, 2004).

O processo de imobilização é afetado por fatores estéricos (Yadhav e Jadav, 2005) principalmente se o reagente utilizado como agente ativante possuir uma molécula pequena. Este problema estérico pode ser contornado com o uso de reagentes no processo de ativação que possuam o efeito de “braço espaçador”, através da utilização de reagentes com moléculas lineares capazes de reagir com o suporte/ligante em uma extremidade e na outra com o grupo reativo da enzima (ou ligante). O reagente etilenodiamina é um exemplo (Fernández-Lafuente *et al.*, 1993). Em alguns casos o

próprio agente ativante pode atuar com o efeito de espaçador, no caso do glutaraldeído, que é muito reativo em valores de pH alcalino (Cardias, 1996).

2.7. Meios reacionais em biocatálise

Dentre as reações catalisadas por enzimas, aquelas de maior interesse industrial são as que envolvem a síntese de éster, que ocorre em condições microaquosas. A utilização de biocatalisadores em ambientes não-aquoso tem recebido crescente atenção nas últimas duas décadas devido às vantagens que oferecem como aumentar a solubilidade dos substratos orgânicos, a possibilidade de realização de processos e a facilidade na recuperação das enzimas e produtos para serem aplicados na química fina (Lozano *et al.*, 2004a).

A estabilidade em solventes orgânicos é uma importante característica de lipases, podendo determinar o uso da enzima como catalisador em reações de síntese, além de predizer quais solventes podem ser utilizados nos meios de reação. Entretanto, apesar das vantagens da biocatálise em meio orgânico, a atividade das enzimas nestes sistemas são normalmente muito menores do que em soluções aquosas (Pencreac'h e Baratti, 2001).

O logaritmo de P ($\log P$) é um dos parâmetros utilizados para a escolha do solvente a ser empregado em sistemas de biocatálise. O $\log P$ é uma medida da hidrofobicidade do solvente e é calculado pelo logaritmo do coeficiente de partição de um dado solvente em um sistema padrão octanol/água. De acordo com Zaks e Klibanov (1988) e Sztajer *et al.* (1992), os solventes que possuem $\log P \leq 2$ são hidrofílicos e não são adequados para a biocatálise, tais como acetona e éteres, são geralmente incompatíveis com a atividade enzimática devido à retirada da água de solvatação da estrutura protéica, inativando-a ou desnaturando-a. Em um aparente paradoxo, a estabilidade das proteínas é menor em solventes miscíveis em água do que nos solventes hidrofóbicos. Os solventes com $\log P$ entre 2 e 4 são menos hidrofílicos hidrofílicos, perturbam fracamente a interação água-biocatalisador e afetam a sua estrutura de maneira imprevisível. Os solventes que possuem $\log P$ superior a 4 são hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, deixando o biocatalisador no seu estado ativo.

Na literatura existem inúmeros estudos de síntese enzimática utilizando lipases em solventes orgânicos. Castro *et al.* (1997) realizaram a síntese do butirato de butila

em hexano, utilizando lipase do pâncreas de porco, suportada em material poroso (celite) obtendo um rendimento de 90%, mostrando a vantagem do uso de biocatalisadores na síntese de ésteres flavorizantes. Chen (1996) avaliou a síntese de butirato de etila em diferentes solventes orgânicos, benzeno, heptano, hexano e octano, utilizando lipase de *Candida cylindracea* imobilizada por encapsulamento em gel. Chulalaksananukul *et al.* (1990) avaliaram o efeito da quantidade de água e a limitação devido à transferência de massa na síntese do oleato de etila usando lipase comercial de *Mucor miehei* em hexano.

Geralmente, os solventes orgânicos utilizados nas sínteses de obtenção de ésteres são bastante tóxicos, por esta razão, o seu uso tem sido restringido. Desta forma, estudos recentes utilizando outros meios não-convencionais têm surgido como alternativas aos clássicos solventes orgânicos.

Alguns autores obtiveram bons resultados para a utilização de fluidos supercríticos (Gunnlaugsdottir *et al.*, 1998, Oliveira e Oliveira, 2001, Celia *et al.*, 2005 e Feirhman, 2005). O uso desta tecnologia traz várias vantagens: substituição de solventes orgânicos, maiores taxas de reação, aumento da seletividade da reação, dissolução de compostos hidrofóbicos, redução de reações paralelas, elevadas taxas de difusão e os produtos são facilmente removidos por despressurização (Mesiano *et al.*, 1999, Knez e Habulin, 2002 e Matsuda *et al.*, 2004).

Lanza *et al.* (2004) estudaram a influência da temperatura, pressão, tempo de exposição e taxas de descompressão na atividade enzimática utilizando lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* verificando perdas inferiores a 15 %. Feirhman (2005) avaliou a atividade enzimática de duas lipases imobilizadas, Lipozyme IM, Novozym 435 e de *Yarrowia lipolytica*, em CO₂, propano e butano SC, todas as três apresentaram perdas inferiores a 10% em CO₂ e propano, enquanto a Novozym 435 apresentou aumento de atividade de até 21% em butano. Oliveira e Oliveira (2001) compararam a alcóolise em SCCO₂ e hexano, obtendo maiores conversões para a síntese em meio supercrítico. Romero *et al.*, (2005) compararam a síntese do isoamil acetato a 40°C e 14 MPa, utilizando lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* e *Rhizomucor miehei*. Gunnlaugsdottir *et al.*, (1998) estudaram a alcóolise em SCCO₂, utilizando lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* e *Humicola lanuginosa* variando a hidrofobicidade do meio reacional.

Além de FSC, líquidos iônicos (Lozano *et al.*, 2004a) e sistemas livres de solvente (Güvenç *et al.*, 2002) têm sido recentemente estudados para a síntese

enzimática em condições microaquosas. LIs são compostos que consistem apenas de íons e são líquidos à temperatura ambiente. Lozano *et al.* (2004a) estudaram o comportamento das lipases (solúvel e imobilizada) comerciais de *Candida antarctica* (CalA e CalB) e de *Mucor miehei* (MML) na síntese de glicidil ésteres, comparando como meio reacional LIs e um clássico solvente orgânico (tolueno), a atividade das enzimas estudadas foi de até 95 vezes maior para os sistemas com LIs. Güvenç *et al.*, (2002) utilizou duas diferentes lipases comerciais imobilizadas, *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica*, na produção de acetato de isoamila, em sistema livre de solventes. A lipase de *C. antarctica* foi mais eficiente na síntese e obteve uma conversão de 80 % para uma razão molar ácido/álcool de 1/2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os principais materiais utilizados e toda a metodologia desenvolvida ao longo deste trabalho.

3.1. Materiais

Para a ativação dos suportes foram utilizados os seguintes reagentes: glicidol (2,3-epóxi-1-propanol) 96 % (v/v) da Sigma-Aldrich, glutaraldeído 25 % (v/v) da Vetec/SP e etilenodiamina (EDA) da J.T. Baker/SP. Para a dosagem da atividade hidrolítica da enzima solúvel e do derivado utilizou-se tampão fosfato (Sørensen) pH 8,0, butirato de para-nitrofenila (PNPB) da Sigma-Aldrich como substrato, tendo como precursor o para-nitrofenol (PNP) da Sigma-Aldrich e 2-propanol. A atividade sintética foi quantificada através da síntese do butirato de butila e foram utilizados ácido butírico e 1-butanol, como substratos, e hexano da Vetec/SP, como solvente. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.1. Enzima

Foram utilizadas as preparações comerciais Novozym[®] CALB L, lipase de *Candida antarctica* tipo B (CalB) na forma solúvel, e Novozym 435, CalB imobilizada por adsorção em suporte de poliacrilamida, gentilmente cedidas pela Novozymes Latin America Ltd. (Brasil). Essa enzima é produzida por fermentação submersa pelo microrganismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae*, possui peso molecular de 33 kDa, ponto isoelétrico 6,0 e suas dimensões são 30 Å × 40 Å × 50 Å (Uppenberg *et al.*, 1994).

3.1.2. Suportes para imobilização

Foi utilizada como suporte para imobilização a resina hidrofílica reativa para cromatografia de afinidade Toyopearl[®] AF Amino 650, com tamanho médio de partícula 65 µm, tamanho médio de poro 1.000 Å, estável em pH 2-13, armazenado em solução

etanólica 20 % (v/v), da Tosoh Bioscience LLC (Pensilvânia, Estados Unidos), gentilmente cedido pelo Prof. Ruben Carbonell, da North Carolina State University (USA).

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação da atividade hidrolítica da enzima solúvel

A atividade hidrolítica da lipase foi quantificada pela hidrólise do PNPB e a produção do PNP foi avaliada espectrofotometricamente utilizando um comprimento de onda de 410 nm, conforme metodologia de Bhatnagar *et al.* (2005).

O método consiste no preparo de três soluções designadas A, B e C. A solução A é PNPB 15 mM em 2-propanol, a solução B é tampão fosfato 100 mM, pH 8,0 e a solução C foi preparada misturando-se 1 mL da solução A com 9 mL da solução B. Na seqüência, um volume de 1 mL da solução C foi mantido à temperatura ambiente numa cubeta de 3 mL, sendo a reação iniciada pela adição de 2 mL de solução enzimática apropriadamente diluída em tampão fosfato pH 8,0. A variação da absorbância a um comprimento de onda de 410 nm foi determinada contra um branco (sem enzima) constituído de 1 mL da solução C e 2 mL da solução B, sendo esta monitorada por 1,5 minutos.

Para a determinação da atividade enzimática foi previamente obtida uma taxa de consumo (hidrólise) do PNPB a partir da construção de uma curva de calibração com diferentes concentrações do precursor deste éster, o PNP. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de PNPB por minuto em pH 8,0 e temperatura ambiente. Dessa forma foi possível avaliar a atividade da enzima solúvel e das alíquotas do sobrenadante no decorrer do processo de imobilização da enzima no suporte (ver Equação 3.1).

$$At = \frac{(Tc \cdot 10^3 \cdot Vr) Fd}{Va} \quad (3.1)$$

em que: At é a atividade enzimática (U/mL), Tc é a taxa de consumo do PNPB

(mmol/L.min), 10^3 é o fator de conversão de mmol para μmol , V_r é o volume final reacional (L), V_a é o volume da amostra da solução de enzima (mL) e F_d é o fator de diluição (volume total de solução para diluição da alíquota dividido pelo volume da alíquota).

3.2.2. Determinação da Concentração de Proteína

O teor de proteína da preparação enzimática comercial e dos sobrenadantes das soluções enzimáticas utilizadas na imobilização foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), baseado na ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* à proteína. Este método foi selecionado em função de não sofrer interferências significativas de cátions e carboidratos, que poderiam estar presentes no extrato enzimático. Utilizou-se como proteína padrão soroalbumina bovina, do inglês *Bovine Serum Albumin* (BSA), para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 0,6 mg/mL.

3.2.3. Eletroforese

Realizou-se ensaio SDS-PAGE (do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) em gel de poliacrilamida 12 % sob condições desnaturantes em uma unidade de eletroforese (miniVE, Amersham Pharmacia Biotech), segundo o método descrito por Schägger e Vonjagow (1987). As bandas foram coradas com o reagente *Coomassie Brilliant Blue R-250* e as massas molares aparentes de proteínas presentes na amostra, foram estimadas usando padrões de BSA (66 kDa).

3.2.4. Purificação da enzima

A preparação comercial de CalB foi submetida a diálise contra tampão fosfato 5 mM a pH 6,0 durante 24 horas a 4° C e a cada 12 horas a solução foi trocada (Ferreira, 2004). Utilizou-se membrana de acetato de celulose 35 mm (Fundação Sardi, São Paulo, Brasil) com corte de 14 kDa de peso molecular. A Figura 3.1 ilustra o método de purificação mediante processo de diálise.

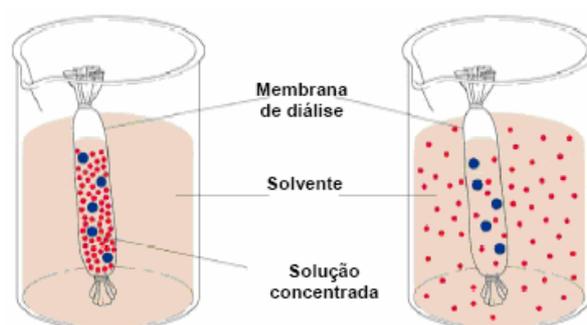


Figura 3.1: Processo de purificação de proteínas por diálise.

Fez-se um tratamento prévio da membrana antes do procedimento de purificação, que consistiu na lavagem com detergente. Em seguida colocou-se, a membrana previamente fervida por 15 minutos, em solução etanólica 50 % (v/v) durante 1 hora por 2 vezes. Finalmente, a membrana foi submersa em uma solução de bicarbonato de sódio 10 mM e EDTA 1 mM durante 1 hora, sendo esta solução trocada 2 vezes. Após esse período a membrana foi colocada por 1 hora em água ultrapura e em seguida foi lavada com a própria solução de diálise.

Após a purificação, a solução de enzima purificada foi armazenada em refrigerador. Alíquotas dessa solução enzimática foram retiradas para medida de atividade hidrolítica e quantificação de proteínas, para cálculo da atividade específica (razão entre atividade enzimática e quantidade de proteína presente em solução) do extrato enzimático antes e após diálise.

3.2.5. Caracterização morfológica do suporte

A caracterização física do suporte Toyopearl foi realizada através da obtenção de difratograma de raio-X, imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e foram avaliadas as propriedades texturais do suporte pelo método BET (Brunauer, Emmett and Teller).

3.2.5.1. Difração de Raio-X

O difratograma da amostra foi obtido através do equipamento difratômetro de raio-X (DRX) da marca Rigaku, empregando radiação de cobre K α de 10 a 70° e 1°/min, com voltagem de 40 KV e uma amperagem de 40 mA, para o suporte Toyopearl.

3.2.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de avaliar a superfície do suporte Toyopearl foram obtidas micrografias a partir de um microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940A a 10 kV. A amostra do suporte foi disposta em placa metálica e sofreu um tratamento prévio com carbono para tornar-se condutora e para melhorar a definição da imagem.

3.2.5.3. Aquisição de isotermas de adsorção e dessorção

A área superficial, o volume total de poros e o diâmetro médio de poro do suporte foram determinados pelo método BET através da obtenção de isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77 K, utilizando o equipamento Autosorb-1 MP.

3.2.6. Ativação do suporte

A resina Toyopearl foi escolhida para utilização como suporte, baseando-se nas suas propriedades químicas, texturais e de resistência mecânica adequadas para obtenção de um biocatalisador de alta performance, para o qual foram abordadas várias estratégias de ativação que resultassem em melhores rendimentos de imobilização e de atividade hidrolítica recuperada. O suporte foi preparado seguindo cinco diferentes estratégias de ativação das quais se obtiveram os seguintes suportes para imobilização: suporte glioxil, suporte glutaraldeído, suporte glioxil-glutaraldeído, suporte glutaraldeído-glioxil e suporte glioxil-EDA-glutaraldeído.

3.2.6.1. Preparação do suporte glioxil

Seguiu-se a metodologia proposta por Guisán (1988) com algumas modificações. A Figura 3.2 mostra o fluxograma do procedimento adotado. O suporte foi previamente lavado com água destilada, em abundância, e foi seco á vácuo. Após esta etapa, foi adicionada 1/5 (m/v) da massa do suporte de água destilada e a suspensão foi mantida sob suave agitação em banho de gelo. Foi preparada uma solução de NaOH 1,7 M e borohidreto de sódio (NaBH₄) 0,75 M equivalente a 1/3 (m/v) da massa do suporte. Acrescentou-se a solução básica de NaBH₄ à suspensão do suporte em água destilada, sob agitação e em banho de gelo para evitar a perda do agente redutor por liberação de H₂. Em seguida, foi adicionado lentamente, 48 % (m/v) do suporte de glicidol, lentamente, sempre mantendo a temperatura abaixo de 25° C. A suspensão foi mantida sob agitação mecânica em recipiente aberto por 18 horas à temperatura ambiente para liberação de H₂ formado no meio reacional. Os grupos hidroxilas presentes no suporte foram ativados a gliceril, para a realização da etapa de oxidação. O suporte gliceril foi seco a vácuo e lavado com água destilada até pH neutro.

Após essa etapa, os grupos gliceril formados na superfície do suporte foram oxidados a glioxil, através da suspensão deste em água destilada na razão 1/10 (m/v) e ao qual foram adicionados 300 μmols de metaperiodato de sódio (NaIO₄) por grama de suporte. Um μmol de NaIO₄ oxida um μmol de OH do suporte, portanto, dependendo do grau de ativação desejado (quantidade de grupos aldeídos/quantidade de hidroxilas na superfície do suporte) a quantidade de periodato necessária deve ser calculada utilizando a Equação 3.2. A oxidação foi mantida sob suave agitação por 2 horas a temperatura ambiente. O suporte oxidado foi lavado exaustivamente com água destilada, para eliminar formaldeído produzido e foi estocado a 4 °C.

$$M_{NaIO_4} (g) = \frac{(\mu\text{moles aldeído} / g \text{ de suporte}) \cdot m_{\text{suporte}} \cdot MM_{NaIO_4}}{1.10^6} \quad (3.2)$$

em que: M_{NaIO_4} é a massa de periodato de sódio utilizada (g), MM_{NaIO_4} é o massa molecular do periodato de sódio (g/gmol), m_{suporte} é a massa do suporte utilizado (g) e a relação μmols aldeído/g de suporte é a concentração de grupos aldeído presentes por massa de suporte.

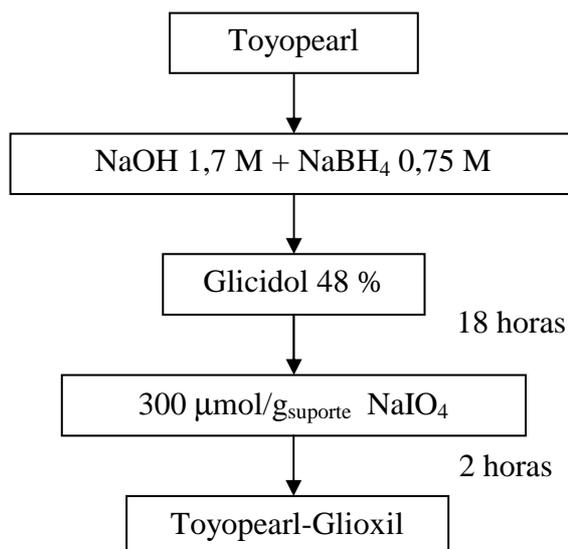


Figura 3.2: Fluxograma de obtenção do suporte Toyopearl-Glioxil.

3.2.6.2. Preparação do suporte glutaraldeído

O suporte previamente lavado com água destilada foi suspenso em uma solução de glutaraldeído 5 % (v/v) em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10, na razão de 1/10 (m/v), a mistura foi colocada sob agitação branda à temperatura ambiente durante 1 hora (Cardias, 1996). Ao final, o suporte foi lavado com água destilada em abundância para a remoção do glutaraldeído residual. A Figura 3.3 ilustra o processo de obtenção do suporte glutaraldeído. Devido o glutaraldeído ser muito reativo, os suportes que utilizam esse reagente no processo de ativação são logo submetidos à imobilização.

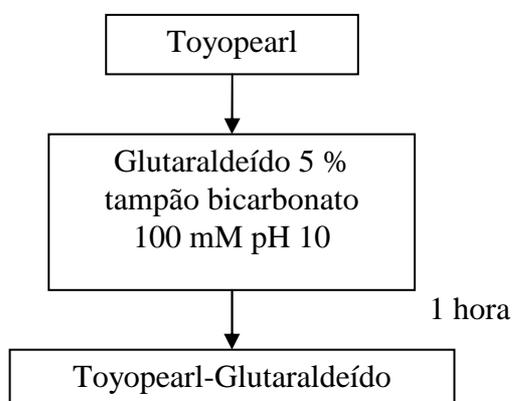


Figura 3.3: Fluxograma de obtenção do suporte Toyopearl-Glutaraldeído.

3.2.6.3. Preparação do suporte glioxil-glutaraldeído

Para a preparação do suporte glioxil-glutaraldeído seguiu-se toda a metodologia descrita no item 3.2.6.1 a partir do qual se obteve o suporte-glioxil e após a sua lavagem, este foi submetido ao procedimento relativo à ativação com glutaraldeído, conforme descrito no item 3.2.6.2.

3.2.6.4. Preparação do suporte glutaraldeído-glioxil

Para a obtenção do suporte glutaraldeído-glioxil, realizou-se primeiramente o procedimento descrito no item 3.2.6.2 a partir do qual se obteve o suporte-glutaraldeído e após a sua lavagem, este foi submetido ao procedimento relativo à ativação com glicidol descrito no item 3.2.6.1.

3.2.6.5. Preparação do suporte glioxil-EDA-glutaraldeído

Para a preparação do suporte glioxil-amino foi adotada metodologia proposta por Fernández-Lafuente *et al.* (1993) com modificações, cujo fluxograma pode ser observado na Figura 3.4. A EDA possui dois grupos amino, um dos seus grupos liga-se ao suporte previamente ativado com glicidol e o outro grupo amino é disponibilizado para a ligação do glutaraldeído, para posterior imobilização da enzima.

Foi preparada, inicialmente, uma solução de EDA 2 M a pH 10. Para cada 1 g de suporte glioxil, previamente ativado segundo o item 3.2.6.1, foram adicionados 4 mL desta solução. Este sistema foi submetido à agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado à suspensão sob agitação 5,71 % (m/m) de NaBH₄, da massa inicial do suporte. O sistema foi mantido por mais 2 horas em agitação branda em frasco aberto sob temperatura ambiente. Após este período, o suporte foi lavado com 1 L de solução tampão acetato 100 mM, pH 4, para remoção do borohidreto residual e posteriormente lavado com 1 L de solução tampão borato 100 mM, pH 9, para o restabelecimento das cargas, pois em pH 4 as aminas ficam positivamente carregadas, sendo então o suporte glioxil-amino lavado com água destilada até pH neutro e seco sob vácuo. Finalmente, adicionou-se ao suporte glioxil-amino solução de glutaraldeído 5 % (v/v) em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10 a uma razão de 1/10 (m/v), a suspensão

foi mantida a temperatura ambiente e sob agitação por aproximadamente 18 horas e ao final deste tempo, o suporte foi lavado com água destilada em abundância para a remoção do glutaraldeído residual.

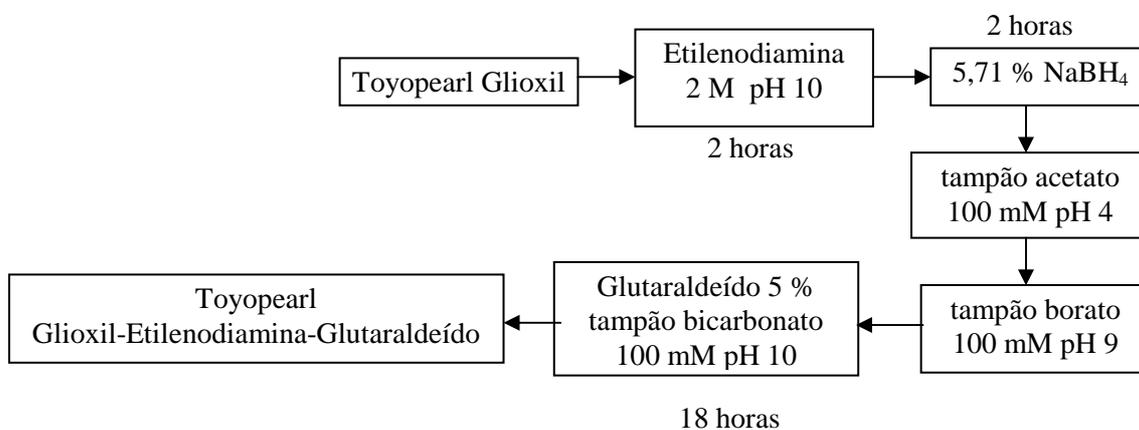


Figura 3.4: Fluxograma do suporte Toyopearl-Glioxil-Etilenodiamina-Glutaraldeído.

3.2.7. Caracterização química do suporte

Quanto à caracterização química, foram obtidos espectros de infravermelho para verificação dos grupos funcionais presentes no suporte antes e após cada etapa de ativação.

3.2.7.1. Análise de Infravermelho

Para a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho foram realizadas análises de infravermelho utilizando espectrômetro Bomem MB-Series. As amostras foram dispostas em pastilhas de KBr, variando o comprimento de onda de 4.000-400 cm⁻¹, contra um branco de KBr. Foram analisadas as estruturas do suporte Toyopearl antes e nas várias etapas do processo de ativação deste suporte.

3.2.8. Imobilização da enzima ao suporte

A imobilização da lipase nos diferentes suportes, previamente ativados com glicidol, glutaraldeído e EDA, foi obtida através do contato destes com solução de enzima em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10, na razão de 1/10 (m/v). Este valor de pH é necessário para que os grupos amino do resíduo lisina da enzima estejam desprotonados e conseqüentemente mais reativos, favorecendo a formação das bases de Schiff entre a enzima e o suporte previamente ativado (Blanco *et al.*, 1989 e Mateo *et al.*, 2006). Para a comparação do rendimento da imobilização para os suportes com diferentes estratégias de ativação, foi oferecida uma baixa concentração de proteína, 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL) de suporte. Dentre estes suportes foi escolhido o de maior atividade recuperada para avaliação da influência da concentração de proteína. Realizou-se um estudo com diferentes concentrações de proteína utilizando-se 10, 20, 40, 60 e 80 mg de proteína/g de suporte para avaliar a relação entre o aumento de enzima oferecida ao suporte com o aumento da atividade recuperada e dos rendimentos de imobilização, assim como o grau de saturação do suporte com enzima.

A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantida sob suave agitação em aparato rotatório, a 25°C por um período de 6 horas. Escolheu-se o tempo de incubação padrão de 6 horas, pois para tempos inferiores, grande quantidade de enzima encontra-se ainda em solução. Foram realizados ensaios de imobilização com tempos maiores de incubação, 12, 24 e 72 horas, para o estudo da influência do tempo de imobilização nas características funcionais do biocatalisador.

Foram retiradas alíquotas da solução enzimática sobrenadante no início e ao término da imobilização para a determinação da atividade hidrolítica inicial e residual, e para a quantificação de proteínas. A alíquota inicial retirada (branco) foi mantida sob as mesmas condições de imobilização (temperatura, pH, agitação e tempo de incubação) para quantificação da perda da atividade final da solução enzimática devido à imobilização e, também, devido à desconformação (desnaturação) da enzima solúvel no meio devido ao pH de imobilização adotado, pH 10. Ao final, o suporte no qual a enzima estava imobilizada (derivado) foi lavado com tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 para a remoção de enzima residual que poderia estar adsorvida. Em seguida este derivado foi lavado com água destilada em abundância até pH neutro e em seguida seco para medida de sua atividade hidrolítica conforme metodologia descrita a seguir no item

3.2.9. Após esse procedimento o mesmo foi estocado em solução tampão fosfato 100 mM, pH 7, e azida sódica 3 % (m/v), para evitar a contaminação do derivado por microrganismos. Os cálculos dos parâmetros de imobilização são descritos a seguir no item 3.2.10.

3.2.9. Determinação da atividade hidrolítica do derivado

Para a determinação da atividade de hidrólise do derivado foram utilizadas as mesmas soluções descritas no item 3.2.1. Foi adicionado 1 mL da solução A a um volume de 29 mL da solução B, a 25 °C sob agitação, sendo a reação iniciada com a adição de 0,01 g de biocatalisador. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 410 nm, alíquotas de 2 mL do sobrenadante foram retiradas a cada 2 minutos e foram lidas imediatamente no espectrofotômetro. Como referência para o espectrofotômetro foi utilizada uma alíquota retirada do meio reacional antes da adição do biocatalisador. A reação de hidrólise foi monitorada durante 12 minutos. A atividade de hidrólise do derivado é dada em unidades por grama de biocatalisador (U/g).

3.2.10. Cálculo dos parâmetros de imobilização

O rendimento de imobilização, ou eficiência, foi calculado com base na atividade hidrolítica da solução de enzima oferecida ao suporte e a atividade residual presente na solução após o processo de imobilização, conforme a Equação 3.3.

$$RI (\%) = \frac{(At_0 - At_f)}{At_0} \times 100 \quad (3.3)$$

em que: RI é o rendimento de imobilização (%); At_0 é a atividade oferecida no início da imobilização presente na solução de enzima (U/mL) e At_f é a atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização (U/mL).

O cálculo da atividade teórica foi determinado como a relação entre a diferença entre a atividade hidrolítica da solução de imobilização inicial e final presentes no sobrenadante, dividida pela massa de suporte utilizado para imobilização e multiplicada pelo volume de enzima utilizado, conforme mostrado na Equação 3.4.

$$At_{teórica} = \frac{(At_0 - At_f)}{m_{suporte}} \times V_{enz} \quad (3.4)$$

em que: $At_{teórica}$ é a atividade teórica (U/g), V_{enz} é o volume de enzima utilizado na imobilização (mL) e $m_{suporte}$ é a massa de suporte utilizado para imobilização (g).

A atividade recuperada, ou retenção de atividade, foi definida pela relação entre a atividade hidrolítica contida no derivado e a atividade teórica no derivado, conforme mostrado na Equação 3.5.

$$At_{recuperada} (\%) = \frac{At_d}{At_{teórica}} \times 100 \% \quad (3.5)$$

em que: $At_{recuperada}$ é a atividade recuperada (%); At_d é a atividade hidrolítica do derivado (U/g de suporte) e $At_{teórica}$ é a atividade teórica (U/g).

3.2.11. Determinação da atividade de síntese do derivado

Utilizou-se a síntese do butirato de butila para a quantificação da atividade de esterificação. Prepararam-se soluções de ácido butírico 0,3 M e butanol 0,3 M em hexano. Em seguida, volumes equivalentes destas soluções foram misturados em um frasco de tampa rosqueada, para evitar perdas por volatilização, com capacidade de 10 mL. Foi retirado 1 mL desta solução para determinar a concentração inicial do ácido butírico. Após adição de 0,1 g do derivado, o frasco foi fechado e mantido sob agitação, a temperatura ambiente. No final da reação, 1 mL da mistura reacional foi retirado para

determinação da concentração final de ácido butírico. Esta alíquota foi adicionada a um erlenmeyer contendo 10 mL de mistura etanol:água destilada (1:1) e 3 gotas de solução etanólica de fenolftaleína, conforme metodologia de Castro *et al.* (1997). A quantidade de ácido butírico consumida foi determinada pela diferença entre os volumes de NaOH 0,02 M consumidos para neutralizar o ácido no início e no final da reação de esterificação. O número de moles de ácido formado foi calculado utilizando a Equação (3.6).

$$n^{\circ} mol_{\text{ác but}} = V_{\text{NaOH}} (L) \times M_{\text{NaOH}} \quad (3.6)$$

em que: $n^{\circ} mol_{\text{ác but}}$ é o número de mols de ácido butírico no meio reacional, V_{NaOH} é o volume de NaOH consumido (L) e M_{NaOH} é a massa molar de NaOH.

A atividade de esterificação foi calculada dividindo-se o número de mols de ácido butírico consumidos, equivalente ao número de mols de butirato de butila formado, pelo tempo de reação e a massa de derivado imobilizado (Equação 3.7).

$$At_{\text{síntese}} = \frac{n^{\circ} mol_{\text{ác but}} \times 10^6}{t_{\text{reação}} \times m_{\text{derivado}}} \quad (3.7)$$

em que: $At_{\text{síntese}}$ é a atividade de síntese do derivado (U/g), $n^{\circ} mol_{\text{ác but}}$ é o número de mols de ácido butírico no meio reacional, $t_{\text{reação}}$ é o tempo de reação (horas) e m_{derivado} é a massa do derivado (g).

3.2.12. Estudo da estabilidade operacional

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada através de ciclos sucessivos com duração de 24 horas da síntese do éster butirato de butila em hexano. Ao final de cada ciclo, o derivado foi removido do meio reacional e lavado com o solvente hexano para ser utilizado na síntese seguinte.

Para se verificar a estabilidade operacional do derivado imobilizado Toyopearl-Glioxil-EDA-Glutaraldeído (Toyo-GEG) com tempo de imobilização de 6 e 72 horas de imobilização, foi pesado 0,1 g destes e foi determinada a atividade de esterificação. Em seguida, esses derivados foram retirados do meio reacional por filtração a vácuo, lavados com hexano e novamente utilizados na reação de esterificação do ciclo seguinte. Foi feito um estudo comparativo utilizando o derivado comercial Novozym 435 adotando-se o mesmo procedimento.

3.2.13. Ensaios de estabilidade térmica

Fez-se um estudo comparativo do efeito da temperatura ao longo do tempo na estabilidade da enzima solúvel e imobilizada, para as temperaturas de 40, 60 e 80° C. Comparou-se a estabilidade térmica dos dois melhores derivados imobilizados produzidos no laboratório, Toyopearl-EDA-Glioxil-Glutaraldeído (Toyo-GEG) e Toyopearl-Glioxil-Glutaraldeído (Toyo-GG), bem como o derivado comercial Novozym 435. Avaliou-se, também o efeito do tempo de imobilização na estabilidade do derivado Toyo-GEG para os períodos de incubação de 6, 12, 24 e 72 horas. A determinação da estabilidade térmica dos derivados imobilizados foi realizada para o ensaio de baixa concentração, 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL) de suporte, pois para o uso de concentrações maiores o efeito difusivo iria influenciar nos resultados de estabilização e, com exceção dos estudos da influência do tempo de imobilização, todos foram preparados com 6 horas de incubação.

Os ensaios de estabilidade térmica foram realizados por meio da incubação, em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 na razão de 1/10 (m/v). Os ensaios foram realizados tanto da enzima solúvel e o derivado Toyo-GEG nas temperaturas de 40, 60 e 80° C e apenas de 60°C para os demais derivados. Em intervalos definidos, amostras foram retiradas e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper o processo de inativação.

As atividades residuais foram determinadas, através da hidrólise do PNPB conforme procedimento descrito no item 3.2.9, para os derivados imobilizados, e no item 3.2.1, para a enzima solúvel. Os ensaios de estabilidade térmica tiveram duração de cerca de 50 horas para os derivados e 50 minutos para a enzima solúvel.

Em todos os casos, a atividade enzimática no início foi definida como 100 % e a atividade ao longo do tempo de incubação foi expressa como porcentagem da atividade inicial (Cardias *et al.*, 1999).

Para o cálculo dos parâmetros de estabilidade térmica, constante de desativação térmica e o tempo de meia-vida da enzima, foram utilizados dois diferentes modelos de ajuste de dados, um de ajuste exponencial não-linear e outro de ajuste linear, pois para alguns dados não foi possível obter os parâmetros através do ajuste exponencial.

3.2.13.1. Método de ajuste exponencial não-linear

A constante de desativação térmica foi calculada pela Equação 3.8, utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (1987).

$$AR = (1 - \alpha) \times e^{-kd \times t} + \alpha \quad (3.8)$$

em que: AR é a atividade relativa (A_t/A_{t_0}), α é a razão entre a atividade enzimática do estado final (A_t) e a atividade enzimática do estado inicial (A_{t_0}), kd é a constante de inativação térmica de primeira ordem (h^{-1}) e t é o tempo de incubação da solução enzimática (h).

O tempo de meia-vida da enzima, definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50 % da atividade inicial, foi calculado pela Equação 3.9.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{kd \times (1 - \alpha)} \quad (3.9)$$

em que: $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida da enzima (h).

3.2.13.2. Método de ajuste linear

A constante de desativação térmica para a enzima solúvel e imobilizada foi

estimada a partir dos dados obtidos experimentalmente em função do tempo, utilizando a Equação 3.10, através de ajuste linear adaptado de Cabral *et al.* (1982).

$$\ln At = \ln At_0 - k_d t \quad (3.10)$$

em que: At é a atividade enzimática do estado inicial (U/mL), At_0 é a atividade enzimática do estado final (U/mL), k_d é a constante de inativação térmica de primeira ordem (hora^{-1}) e t é o tempo de incubação da solução enzimática (horas).

O tempo de meia-vida da enzima é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50 % da atividade inicial, foi calculado a partir da Equação 3.11 utilizando o parâmetro k_d estimado a partir da Equação 3.10.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0,5}{-k_d} \quad (3.11)$$

em que: $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida da enzima (horas).

O fator de estabilidade foi definido como a razão entre os tempos de vida do derivado e da enzima solúvel conforme Equação 3.12.

$$FE = \frac{t_{1/2 \text{ derivado}}}{t_{1/2 \text{ enzima solúvel}}} \quad (3.12)$$

em que: FE é o fator de estabilidade, $t_{1/2 \text{ derivado}}$ é o tempo de meia-vida do derivado (horas) e $t_{1/2 \text{ enzima solúvel}}$ é o tempo de meia-vida da enzima solúvel (horas).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, serão descritos os resultados obtidos para o estudo da lipase de *C. antarctica* B na forma solúvel e imobilizada, avaliando-se a otimização das estratégias de ativação, condições de imobilização para o suporte e os parâmetros de estabilidade térmica e operacional para os derivados obtidos.

4.1. Caracterização da solução comercial de CalB

Realizou-se a caracterização da preparação da enzima solúvel através da determinação da atividade de hidrólise, quantificação de proteínas e determinação da atividade específica do extrato enzimático. Fez-se ainda um ensaio de eletroforese para verificar a possível existência de outras proteínas na solução. Foi necessária caracterização prévia da solução comercial de CalB para a quantificação da sua atividade hidrolítica usando PNPB como substrato, devido a necessidade de quantificar a atividade e a concentração de proteína oferecida ao suporte nos processos de imobilização e, ensaio de eletroforese para verificar a pureza do extrato com relação a presença de outras proteínas que podem interferir nos processos de imobilização.

4.1.1. Atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica da enzima solúvel, extrato comercial bruto de lipase do tipo B de *C. antarctica*, apresentou um valor de $2.574,705 \pm 50,56$ U/mL, determinado em triplicata utilizando o PNPB como substrato. Este método para a quantificação da atividade foi escolhido devido a sua sensibilidade, pois permite a determinação de pequenas variações na concentração do substrato e, conseqüentemente, a utilização de baixas concentrações de enzima. Outro fator que influenciou a escolha desta reação modelo foi a maior afinidade da lipase de *C. antarctica* tipo B por substratos (ésteres de ácidos graxos) de cadeia curta (Martinelle *et al.*, 1995). O extrato enzimático de CalB apresentou uma concentração de proteína de 10,88 mg de proteína/mL de solução. A partir destes resultados foi possível calcular também sua atividade específica cujo valor obtido foi de $238,399 \pm 4,68$ U/mg de proteína no extrato.

4.1.2. Eletroforese

Para a análise qualitativa do extrato enzimático, realizou-se um ensaio de eletroforese da solução comercial de enzima (Figura 4.1) para verificação da pureza do substrato com relação à CalB. Foram comparados os tempos de migração do padrão BSA com as proteínas presentes na amostra de enzima.

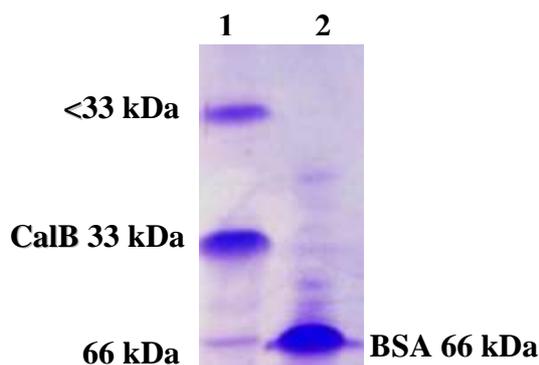


Figura 4.1: Ensaio de eletroforese para o padrão BSA (1) e para a preparação comercial de CalB (2).

O eletroforetograma mostrou a presença de mais duas proteínas além da CalB, uma de tamanho maior, tamanho semelhante à proteína utilizada como padrão BSA (66 kDa) e outra de tamanho menor que 33 kDa, com relação a CalB.

Para a obtenção de derivados com uma concentração maior de CalB ligada ao suporte se faz a necessário purificar o extrato enzimático para remover as proteínas menores pois a imobilização não é um método seletivo, pois devido estas se difundirem mais rápido, ligam-se preferencialmente aos grupos reativos presentes na superfície do suporte.

4.1.3. Purificação da enzima

Devido à presença de outras proteínas na solução comercial, previamente detectadas através do ensaio de eletroforese, fez-se necessária uma purificação da preparação enzimática. Realizou-se uma diálise para eliminar e/ou diminuir as impurezas protéicas presentes (de tamanho menor que a CalB), para a realização do estudo da influência de altas concentrações de enzima na imobilização. As proteínas

menores, devido à sua velocidade de difusão menor no meio, preencherão os grupos reativos do suporte ativado preferencialmente. Em outras palavras, elas podem interferir na imobilização da CalB nos suportes, competindo pela superfície e pelos sítios ativos de ligação.

Após o procedimento de diálise, verificou-se perda na atividade hidrolítica, de $39,540 \pm 0,22$ %, uma vez que a solução resultante apresentou atividade de $1.546,940 \pm 34,44$ U/mL. A perda de cerca de 40 % na atividade hidrolítica no extrato enzimático parece ser economicamente inviável, mas o processo de diálise se torna imprescindível devido a presença de outras proteínas menores que a CalB, pois estas atingem mais rapidamente a superfície do suporte, portanto, a realização deste procedimento, aumenta a atividade enzimática efetivamente ligada ao suporte. Essa perda se deve à adsorção da CalB à membrana, de material celulósico do material e à desestabilização das proteínas em solução devido a perda de agentes estabilizantes.

O extrato enzimático de CalB após diálise apresentou uma concentração de proteína de 1,43 mg de proteína/mL de solução. A partir destes resultados foi possível calcular também sua atividade específica cujo valor obtido foi de $1.083,291 \pm 24,12$ U/mg de proteína no extrato. Apesar da grande perda de proteínas em solução, observou-se que a perda de atividade não foi tão significativa já que o resultado obtido de atividade específica foi bastante alto, quando comparado com a atividade específica do extrato bruto, a diálise apresentou a vantagem de remover proteínas indesejadas, favorecendo a obtenção de derivados imobilizados com alta concentração enzimática, aumentando dessa forma a atividade enzimática efetivamente presente em solução e, conseqüentemente, no suporte.

4.2. Caracterização morfológica do suporte

A partir da caracterização morfológica do suporte foi possível obter mais informações sobre a estrutura, a cristalinidade do suporte e suas propriedades texturais.

4.2.1. Difração de Raio-X

Fez-se uso de análise de DRX para avaliar o grau de cristalinidade de amostra do suporte previamente calcinado. O difratograma para o suporte Toyopearl exibiu apenas uma forte reflexão na região de $5 < 2\theta < 50$, ou seja, o material não possui estrutura cristalina (Figura 4.2), uma vez que o gráfico obtido não apresentou muitos picos, apenas um, típico de uma estrutura amorfa, característica desejável para o processo de imobilização. Os compostos cristalinos têm uma rede organizada, com menor número de interstícios e superfície mais uniforme, o que pode reduzir, neste caso, a imobilização de enzimas em um determinado suporte. Por isso, a utilização de materiais amorfos é a mais recomendada para esta finalidade (Yadav e Jadhav, 2005).

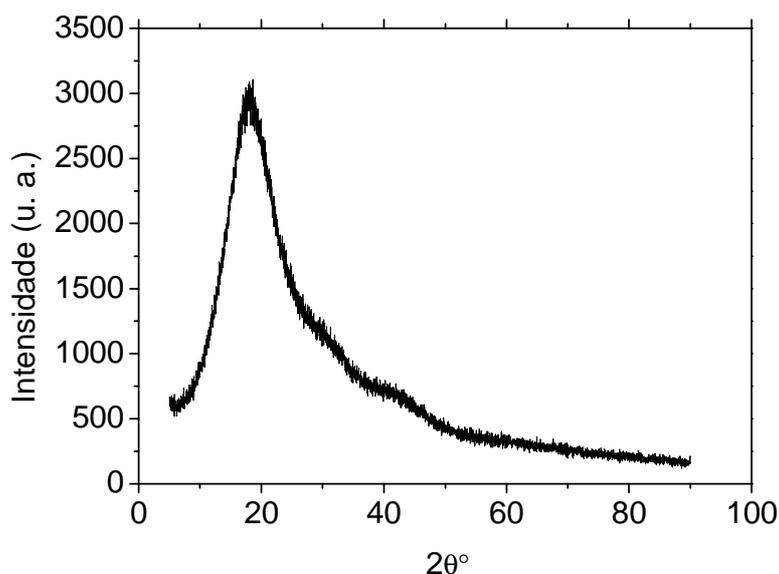


Figura 4.2: Difratograma de raio-X (DRX) para o suporte Toyopearl.

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 4.3 mostra as micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV). Lembrando que a estrutura do suporte foi previamente tratada com recobrimento de carbono para se tornar condutora para a obtenção das micrografias. Através das imagens obtidas foi observado um sistema homogêneo. O suporte possui estrutura de grão com tamanho de partícula uniforme e de formato esférico.

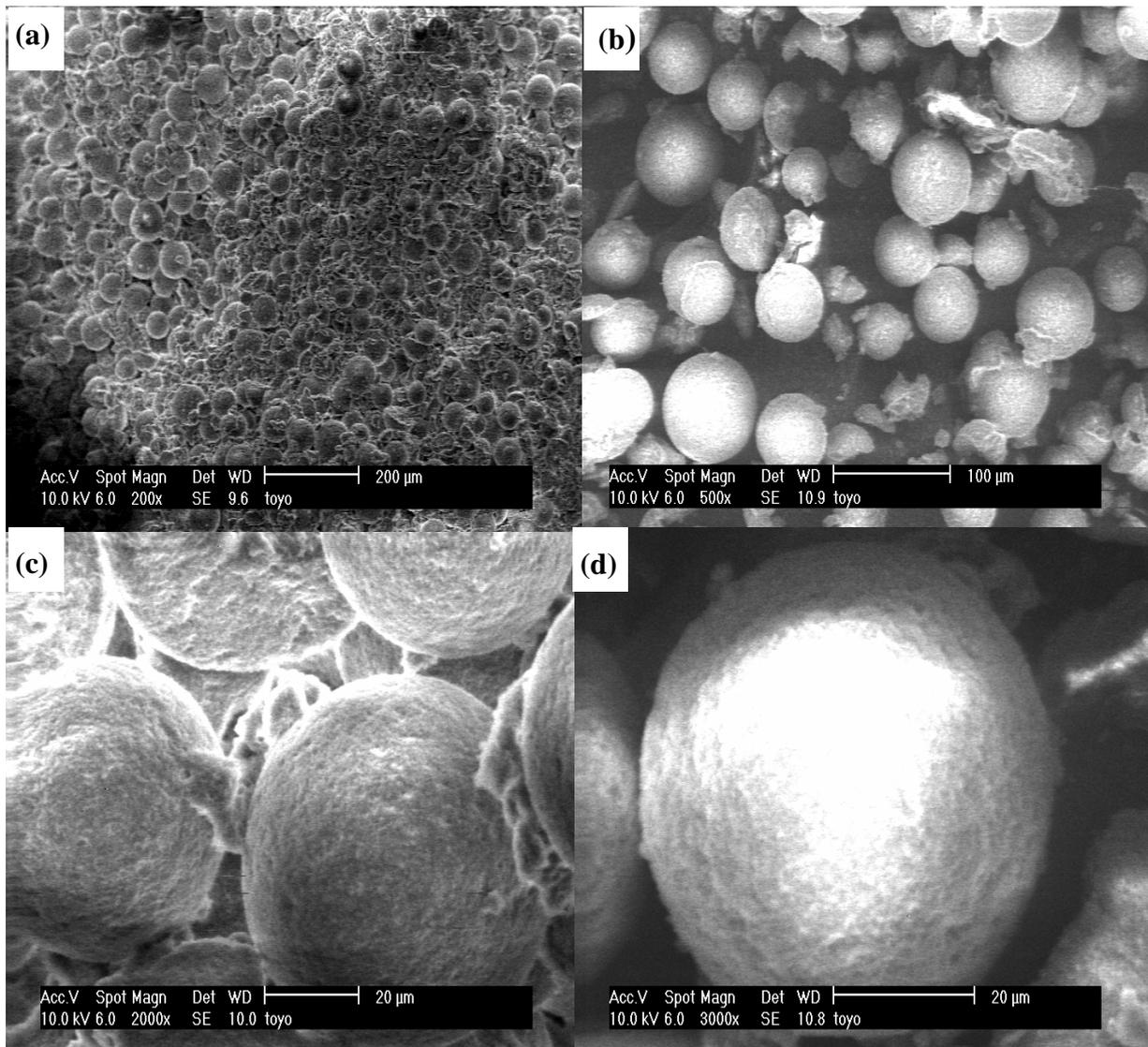


Figura 4.3: Imagens obtidas do suporte Toyopearl através de microscópio eletrônico de varredura (MEV), (a) com aumento de 200 vezes, (b) com aumento de 500 vezes, (c) com aumento de 2.000 vezes e (d) com aumento de 3.000 vezes.

4.2.3. Determinação das propriedades texturais

As isotermas de adsorção e dessorção do nitrogênio (N_2) para a amostra do suporte Toyopearl, previamente calcinado, são apresentadas na Figura 4.4.

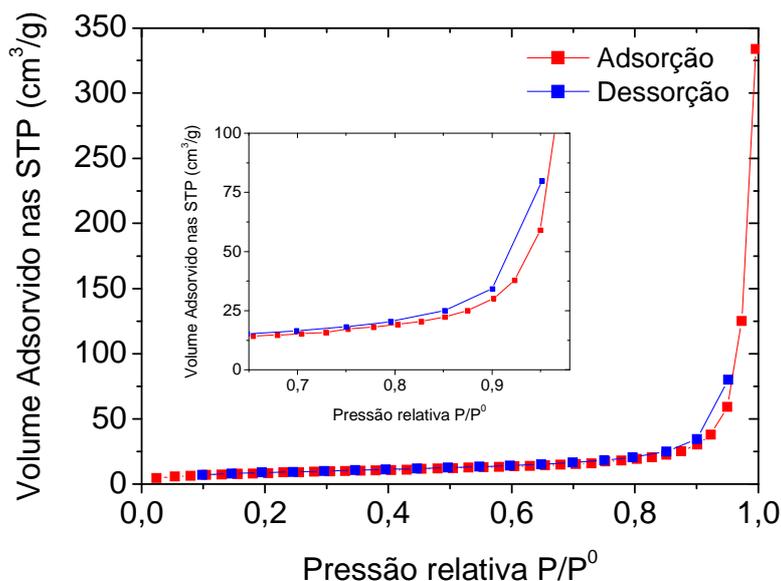


Figura 4.4: Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (N_2) para o suporte Toyopearl.

A área superficial, o volume de poros e o diâmetro de poro foram determinados pela adsorção de N_2 através do método multipontual BET (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Propriedades texturais para o suporte Toyopearl determinadas pelo método BET através da adsorção de N_2 a 77 K.

Área Superficial Total (m^2/g)	Volume Total de Poros (cm^3/g)	Diâmetro Médio de Poro (Å)
29,72	0,5192	690,9

O suporte possui uma boa área superficial, apresentando poros com tamanho relativamente grande (macroporos). A área superficial total obtida por este método abrange não só a superfície do material, como também, a área superficial interna. O valor médio encontrado para o diâmetro de poro para o suporte foi bem maior que as dimensões da CalB, $30 \text{ Å} \times 40 \text{ Å} \times 50 \text{ Å}$ (Uppenberg *et al.*, 1994). Toda a área superficial externa e interna avaliada está disponível para a imobilização da enzima, pois o tamanho do poro permite o acesso da CalB em seu interior para a ligação. A enzima imobilizada nos poros está protegida contra a inativação ocasionada por agentes

externos, permitindo obter derivados com maior estabilidade operacional (Mateo *et al.*, 2007).

4.3. Estudos de imobilização para os suportes ativados

Para a preparação dos suportes foram utilizados três métodos diferentes, realizando uma combinação dessas três metodologias totalizando cinco diferentes estratégias de ativação dos suportes. Essas metodologias foram previamente estudadas por Silva (2007) para a ativação de suportes com grupos hidroxila e amino (quitosana) para imobilização de CalB. Com o objetivo de avaliar as várias estratégias de ativação para o suporte Toyopearl, para cada estratégia, procedeu-se a imobilização da lipase, sob as mesmas condições, para avaliação dos parâmetros de imobilização. Os resultados obtidos estão listados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Parâmetros avaliados na imobilização de lipase do tipo B de *C. antarctica*, utilizando concentração de proteína de 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL), com tempo de incubação de 6 horas, pH 10, 25° C em suportes com diferentes estratégias de ativação.

Suporte Toyopearl	Atividade do derivado (U/g)	Atividade recuperada (%)	Rendimento (%)
Glioxil	$96,90 \pm 43,60$	$1,27 \pm 0,10$	$17,75 \pm 4,04$
Glioxil-Glutaraldeído	$313,88 \pm 13,20$	$6,53 \pm 0,43$	$32,79 \pm 3,47$
Glutaraldeído	$235,39 \pm 0,00$	$6,58 \pm 0,25$	$43,11 \pm 0,94$
Glutaraldeído-Glioxil	$102,25 \pm 14,02$	$2,01 \pm 0,12$	$11,35 \pm 1,91$
Glioxil-EDA-Glutaraldeído	$894,17 \pm 43,29$	$23,77 \pm 3,36$	$24,45 \pm 1,82$

Escolheu-se o tempo de incubação de 6 horas para a imobilização baseado em estudos anteriores e nos perfis de imobilização em função do tempo para a CalB em suportes com os mesmos reagentes de ativação (Silva, 2007). Adotou-se o pH de imobilização 10, pois para esse valor de pH, os resíduos lisina da enzima são mais reativos o que favorece a ligação da enzima ao suporte pela formação das bases de Schiff (Mateo *et al.*, 2000). Cabe ressaltar que estes resultados foram obtidos utilizando a preparação comercial de CalB pura, sem ser dialisada, com uma concentração de proteína de 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL) de suporte.

Na obtenção do derivado Toyopearl-Glioxil foi utilizado apenas glicidol como agente ativante. Este derivado apresentou os menores valores de atividade hidrolítica e atividade recuperada e um baixo rendimento de imobilização, estes resultados mostram que o glicidol só reage com os grupos amino da enzima e que os grupos aldeído resultantes da ativação com glicidol possuem baixa reatividade, quando comparados com aqueles em que se utilizaram agentes como o glutaraldeído, por exemplo. Portanto, poucas unidades da enzima se ligaram aos suportes em que se utilizou glicidol como etapa única ou final de ativação. A baixa atividade recuperada indica a ocorrência de impedimento estérico com relação à ligação da enzima ao suporte, isto ocorre devido a molécula de glicidol ser bastante pequena.

A preparação do suporte com glutaraldeído seguido de ativação com glicidol (Toyopearl-Glutaraldeído-Glioxil) não apresentou aumento significativo nos resultados de atividade. O glutaraldeído reagiu com boa parte dos grupos funcionais do suporte e o glicidol reagiu com os grupos remanescentes, devido à alta reatividade do glutaraldeído, as ligações estabelecidas com esse agente são muito instáveis e são reversíveis, resultando em um rendimento de imobilização menor que o exibido pelo suporte tratado apenas com glicidol, este suporte comportou-se como se apenas esse agente tivesse sido utilizado.

A utilização isolada de glutaraldeído na ativação (Toyopearl-Glutaraldeído) e após a utilização de glicidol (Toyopearl-Glioxil-Glutaraldeído) ocasionou um aumento do rendimento de imobilização e das atividades do derivado, isto se deve ao fato deste agente ativante ser bastante reativo, desse modo, uma maior quantidade de enzima ligase ao suporte, além disso, a molécula de glutaraldeído é grande, reduzindo dessa maneira os efeitos estéricos, inerentes aos processos de imobilização. Para estas duas estratégias foram obtidos os maiores valores de rendimento de imobilização, mas os valores encontrados para as atividades recuperadas para esses suportes não tiveram aumentos muito significativos, isto ocorreu devido os efeitos de desnaturação decorrentes do grande número de enzimas ligadas. Vale ressaltar que devido à alta reatividade deste reagente faz-se necessário a imobilização imediata após o preparo destes suportes.

O melhor resultado de atividade (U/g de suporte) foi obtido para a imobilização em Toyopearl-Glioxil-EDA-Glutaraldeído (Toyo-GEG). No entanto, neste caso, o rendimento de imobilização foi de apenas $24,45 \pm 1,82$ %, que foi menor que os rendimentos obtidos para Toyopearl-Glioxil-Glutaraldeído e Toyopearl-Glutaraldeído,

isto ocorre devido um número maior de enzimas ligarem-se ao suporte, mas os efeitos desnaturantes foram menos intensos, pois as enzimas permaneceram em sua forma ativa. O reagente EDA tem a função de tornar a distância entre os grupos aldeído e o suporte maior, com o intuito de aumentar a capacidade do suporte em imobilizar enzimas atuando na redução direta dos efeitos estéricos, através da redução de limitações difusionais, e no aumento da hidrofobicidade do suporte. Estes resultados indicam que a enzima, ao se ligar ao suporte Toyopearl-Glioxil-EDA-Glutaraldeído, sofreu menores distorções em sua estrutura, levando a uma menor perda de atividade catalítica, devido ao alto valor obtido para a atividade recuperada ($23,77 \pm 3,36 \%$) deste suporte, devido ao extenso braço de ligação ter conferido a enzima imobilizada uma maior mobilidade, dando uma maior acessibilidade dos sítios ativos ao substrato, apresentando assim um melhor resultado quando comparado aos outros derivados. O emprego de compostos que aumentam a distância entre a enzima e o suporte teve um efeito direto no aumento da atividade hidrolítica e dos rendimentos de imobilização dos derivados. Quanto maior o espaço entre a enzima e o suporte melhores são os resultados exibidos pelos parâmetros de imobilização.

Fez-se ainda uma comparação entre a enzima imobilizada em Toyopearl-Glioxil-EDA-Glutaraldeído e um derivado comercial Novozym 435 (CalB imobilizada), cuja atividade hidrolítica foi de $571,478 \pm 55,47$ U/g, medida nas mesmas condições. Observou-se que a atividade hidrolítica do derivado Toyopearl-GEG foi de 1,56 vezes maior do que a obtida para Novozym 435. Baseado nestes resultados, selecionou-se o suporte Toyopearl-Glioxil-EDA-Glutaraldeído, aqui denominado de Toyo-GEG, para otimização das condições de imobilização.

4.4. Caracterização química dos suportes

Quanto à caracterização química foram obtidos espectros vibracionais na região do infravermelho (IR) para verificação dos grupos funcionais presentes no suporte e após cada etapa de ativação. Os espectros podem ser observados nas Figuras 4.5 a 4.13. Quanto maior a área da deformação referente ao grupo maior à concentração destes grupos funcionais no suporte, sendo possível relacionar a intensidade da deformação com a quantidade de grupos presentes no suporte. Pode-se, ainda, comparar os valores de rendimentos de imobilização e de atividade recuperada com a quantidade de grupos

aldeído incorporados após o processo de ativação. As principais frequências vibracionais do suporte, nas regiões espectrais específicas para cada etapa de preparação, foram comparadas com as da literatura (Silverstein *et al.*, 1994) e são ilustradas nas Tabelas 4.3 a 4.11.

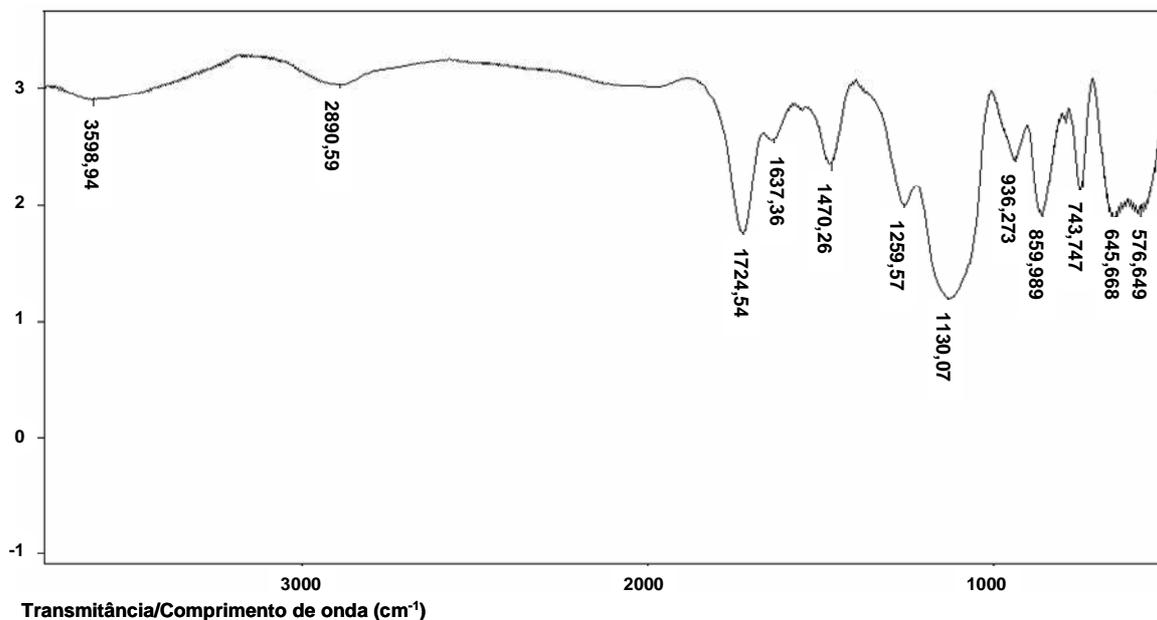


Figura 4.5: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte Toyopearl antes dos processos de ativação.

Tabela 4.3: Frequências vibracionais do suporte Toyopearl.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuições das deformações
3598	axial O – H
2890	axial N – H
1724	angular N – H
1470	angular O – H
1130	axial C – O – C

A resina hidrofílica reativa Toyopearl possui grupos hidroxila e amino em sua estrutura, estes grupos são responsáveis pelas deformações no espectro IR (Figura 4.5) nas frequências de 1470 e 2890 cm⁻¹ (Tabela 4.3), respectivamente. Os grupos hidroxila

e amino foram utilizados para a ativação do suporte através da reação com os reagentes: glicidol, etilenodiamina e glutaraldeído.

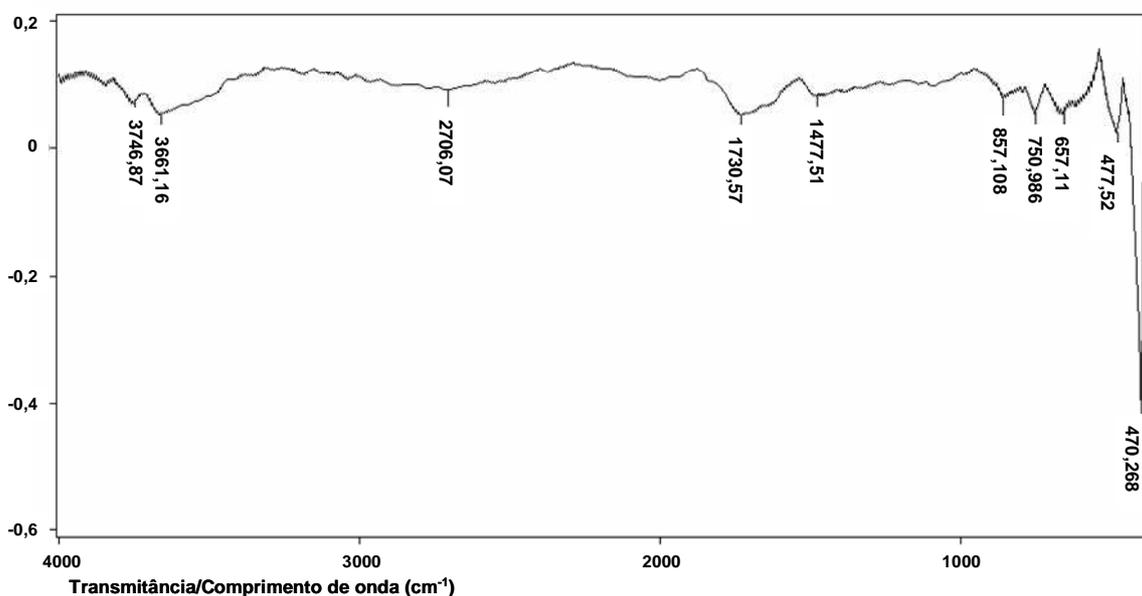


Figura 4.6: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-gliceril após a etapa de ativação com glicidol sem oxidação.

Tabela 4.4: Frequências vibracionais do suporte-gliceril após a etapa de ativação com glicidol sem oxidação.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuições das deformações
3746	axial N – H
3661	axial O – H
1730	angular N – H
1477	axial C – O – C

Após a etapa de ativação com glicidol, sem o procedimento de oxidação, o suporte Toyopearl é denominado de suporte-gliceril. Além de possuir grupos hidroxila e amino em sua estrutura também possui um grupo éter, o que foi comprovado pelo aparecimento da deformação na frequência de 1086 cm⁻¹ (Tabela 4.4) no espectro IR (Figura 4.6).

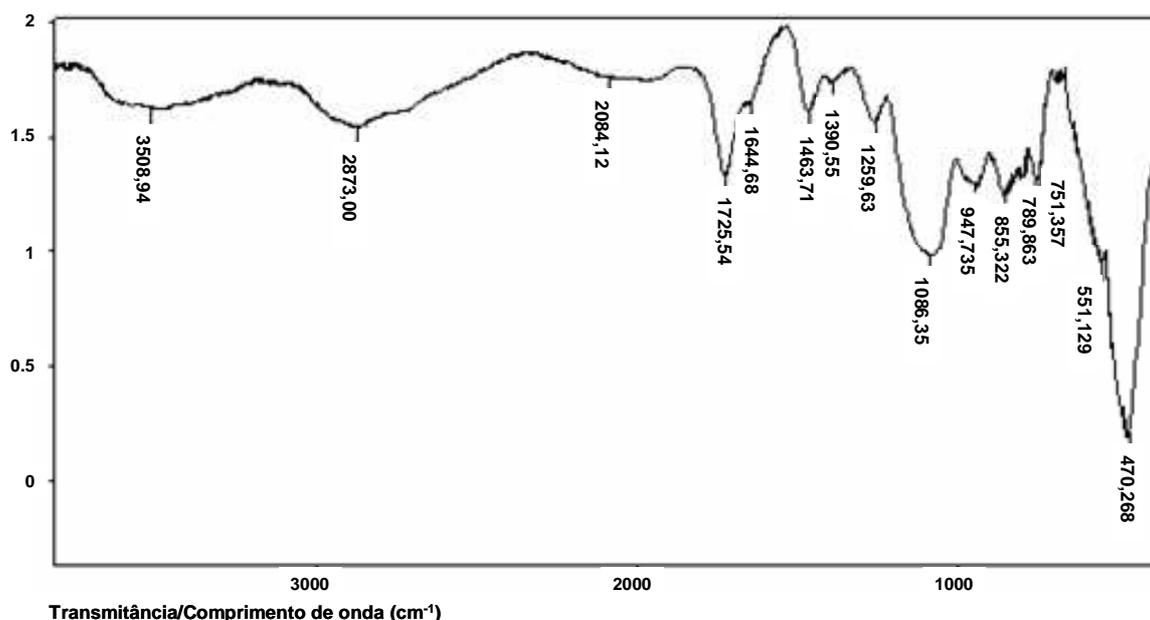


Figura 4.7: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glioxil após a etapa de ativação com glicidol precedida de oxidação com NaIO_4 .

Tabela 4.5: Frequências vibracionais do suporte-glioxil após a etapa de ativação com glicidol precedida de oxidação com NaIO_4 .

Frequência (cm^{-1})	Atribuições das deformações
3508	axial N – H
1725	axial O = C – H
1086	axial C – O – C

Após a etapa de ativação com glicidol, o suporte-gliceril foi oxidado a suporte-glioxil. Além dos grupos hidroxila, amino e éter em sua estrutura, também possui grupo aldeído, caracterizado pelo aparecimento da deformação na frequência de 1725 cm^{-1} (Tabela 4.5). Para o derivado obtido através da imobilização da CalB a este suporte, obteve-se um rendimento de $17,75 \pm 4,04 \%$ com baixo valor atividade recuperada ($1,27 \pm 0,10 \%$). A intensidade da deformação referente ao grupo aldeído (Figura 4.7) presente no suporte foi relativamente pequena quando comparada a dos outros suportes obtidos para a imobilização, além do mais, os grupos aldeído provenientes da ativação com glicidol são pouco reativos quando comparados aos grupos aldeído formados com

ativação por glutaraldeído, o que pode explicar os baixos valores obtidos para atividade do derivado, atividade recuperada e rendimento de imobilização.

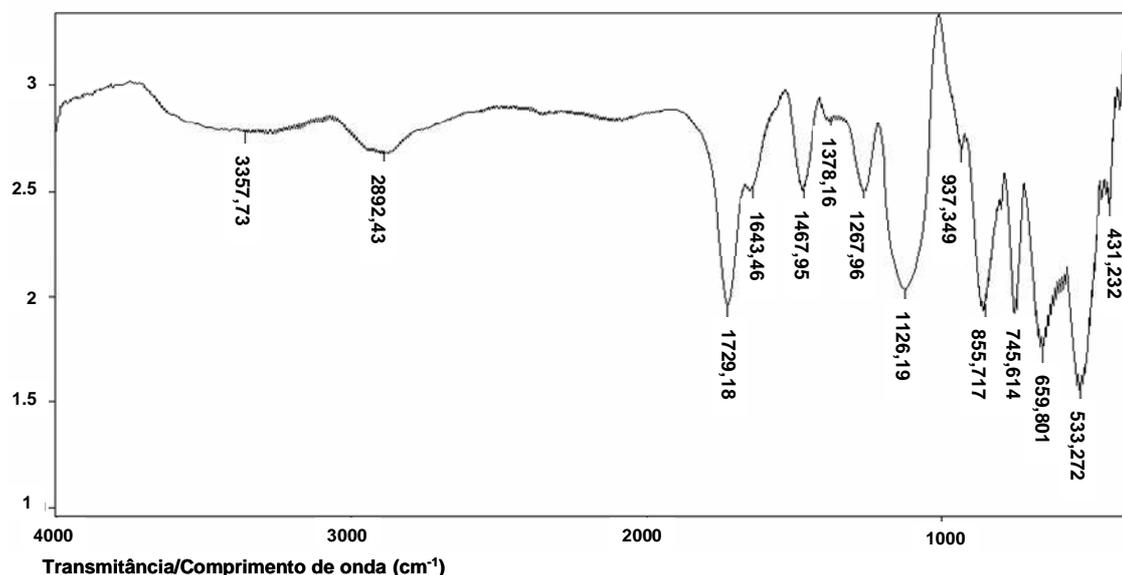


Figura 4.8: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glutaraldeído após a etapa de ativação com glutaraldeído.

Tabela 4.6: Frequências vibracionais do suporte-glutaraldeído após a etapa de ativação com glutaraldeído.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuições das deformações
3357	axial O – H
1729	axial O = C*
1467	axial N = C
1126	axial C – O – C

* referente ao grupo aldeído

Após a ativação do suporte com glutaraldeído, há formação de base de Schiff, como se pode ver pelo aparecimento de deformações referentes à amina secundária e grupos aldeído, hidroxila e éter no suporte (Figura 4.8), verificados pela presença das frequências vibracionais características para estes respectivos grupos funcionais (Tabela 4.6). Quando comparado aos demais suportes, este derivado apresentou maior

rendimento de imobilização, $43,11 \pm 0,94$ %, e valor de atividade recuperada, $6,58 \pm 0,25$ % não tão alto. A maior intensidade de deformação para o grupo aldeído observada no suporte Toyopearl-glutaraldeído foi atribuída ao alto valor obtido para o rendimento de imobilização. Este resultado também se deve ao fato da ativação com glutaraldeído produzir grupos aldeído mais reativos quando comparados com aqueles ativados com glicidol. Esperava-se um resultado melhor de atividade recuperada, uma vez que este derivado exibiu o maior rendimento de imobilização, portanto uma alta quantidade de enzima ligou-se ao suporte. No entanto, o grande número de grupos aldeído reativos pode ter causado uma redução na mobilidade e, conseqüentemente, distorção na molécula de enzima. Outra explicação seria a influência de problemas de transferência de massa, devido ao tamanho da molécula de glutaraldeído, pois ela não é tão grande o suficiente para dar uma maior acessibilidade dos substratos à enzima, levando à valores subestimados para a atividade específica do derivado.

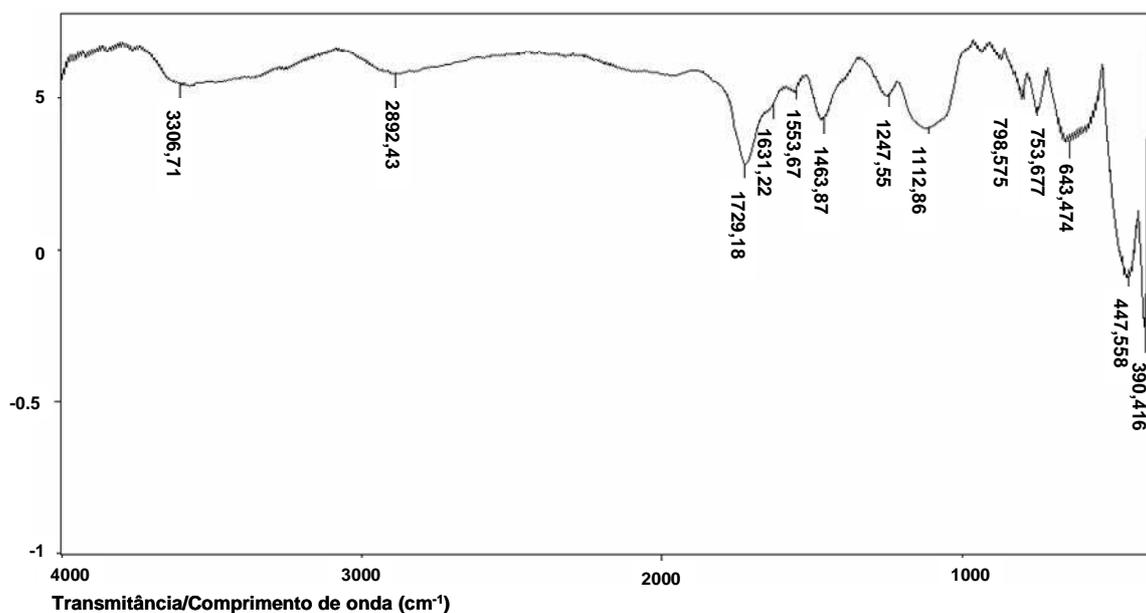


Figura 4.9: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glioxil-glutaraldeído após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO_4 , e com glutaraldeído.

Tabela 4.7: Frequências vibracionais do suporte-glioxil-glutaraldeído após a etapa de ativação com glicidol seguido de oxidação e com glutaraldeído.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuições das deformações
3606	axial O – H
1729	axial O = C*
1463	axial N = C
1112	axial C – O – C

* referente ao grupo aldeído

Depois das etapas de ativação com glicidol seguido de oxidação e nova ativação com glutaraldeído, observa-se a presença de base de Schiff e grupos aldeído no suporte, da mesma forma verificados pela presença das frequências vibracionais características (Tabela 4.7). A deformação referente ao grupo aldeído para este suporte foi a maior dentre todos os suportes avaliados (Figura 4.9), ou seja, este suporte apresenta uma grande quantidade de grupos funcionais aldeído. Para este derivado, obteve-se um rendimento de $32,79 \pm 3,47$ % e valor de atividade recuperada igual a $6,53 \pm 0,43$ %. Assim como o suporte-glutaraldeído, esperava-se um resultado melhor de atividade recuperada, pois este derivado exibiu um dos maiores rendimentos de imobilização, portanto uma grande quantidade de enzima estabeleceu ligação com o suporte, tendo possivelmente ocasionando distorções na estrutura enzimática.

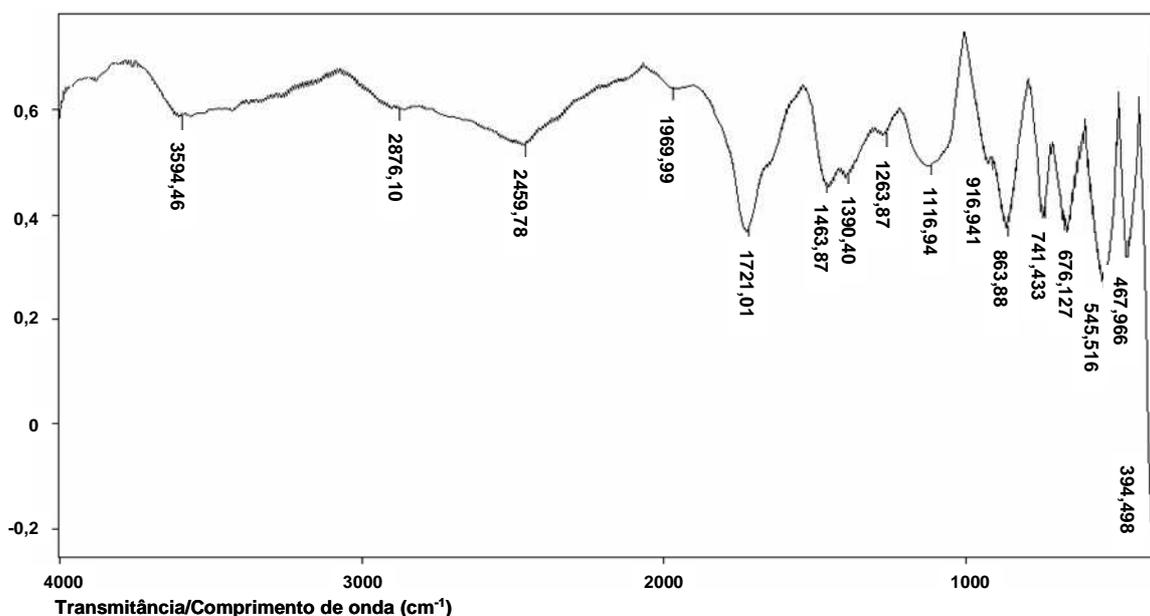


Figura 4.10: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glutaraldeído-gliceril após a etapa de ativação com glutaraldeído e com glicidol antes da etapa de oxidação com NaIO_4 .

Tabela 4.8: Frequências vibracionais do suporte-glutaraldeído-gliceril após a etapa de ativação com glutaraldeído e com glicidol antes da oxidação com NaIO_4 .

Frequência (cm^{-1})	Atribuições de deformações
3594	axial O – H
1721	axial O = C – H
1463	axial N = C
1116	axial C – O – C

Após a etapa de ativação com glutaraldeído e com glicidol antes da etapa de oxidação com NaIO_4 , o suporte possui ligações do tipo base de Schiff e grupos aldeído, hidroxila e hidroxila em sua estrutura, o que foi devidamente comprovado pelo aparecimento das deformações nas frequências características (Tabela 4.8) no espectro IR (Figura 4.10).

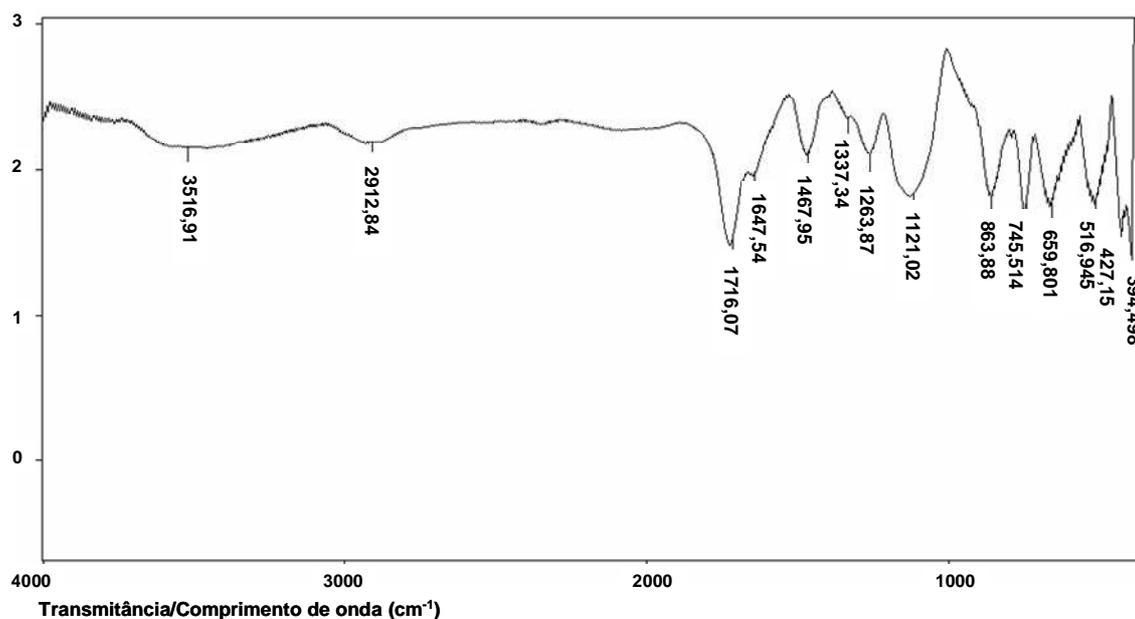


Figura 4.11: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glutaraldeído-glioxil após a etapa de ativação com glutaraldeído e com glicidol seguido de oxidação com NaIO₄.

Tabela 4.9: Frequências vibracionais do suporte-glutaraldeído-glioxil após a etapa de ativação com glutaraldeído e com glicidol seguido de oxidação com NaIO₄.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuições de deformações
1716	axial O = C – H
1467	axial N = C
1121	axial C – O – C

Através do aparecimento das deformações no espectro IR (Figura 4.11), verificou-se a presença base de Schiff e grupos aldeído e éter no suporte após a ativação com glutaraldeído e com glicidol, seguido de oxidação com NaIO₄, verificados pelas suas respectivas frequências vibracionais características (Tabela 4.9). Para o derivado Toyopearl-glutaraldeído-glioxil, obteve-se o menor dos rendimentos de imobilização, $11,35 \pm 1,91$ % com valor de atividade recuperada também, relativamente baixo, $2,01 \pm 0,12$ %, porém maior que aquele encontrado para o suporte-glioxil. A intensidade da deformação referente ao grupo aldeído neste suporte é relativamente pequena, em relação aos outros suportes avaliados. Embora o glutaraldeído tenha reagido com boa

parte dos grupos funcionais do suporte e o glicidol reagido com os grupos remanescentes, devido à alta reatividade do glutaraldeído, as ligações estabelecidas com esse agente são muito instáveis e reversíveis, resultando em um rendimento de imobilização menor que o suporte tratado apenas com glicidol. O suporte Toyoglutaraldeído-glioxil se comportou como se apenas esse glicidol tivesse sido utilizado.

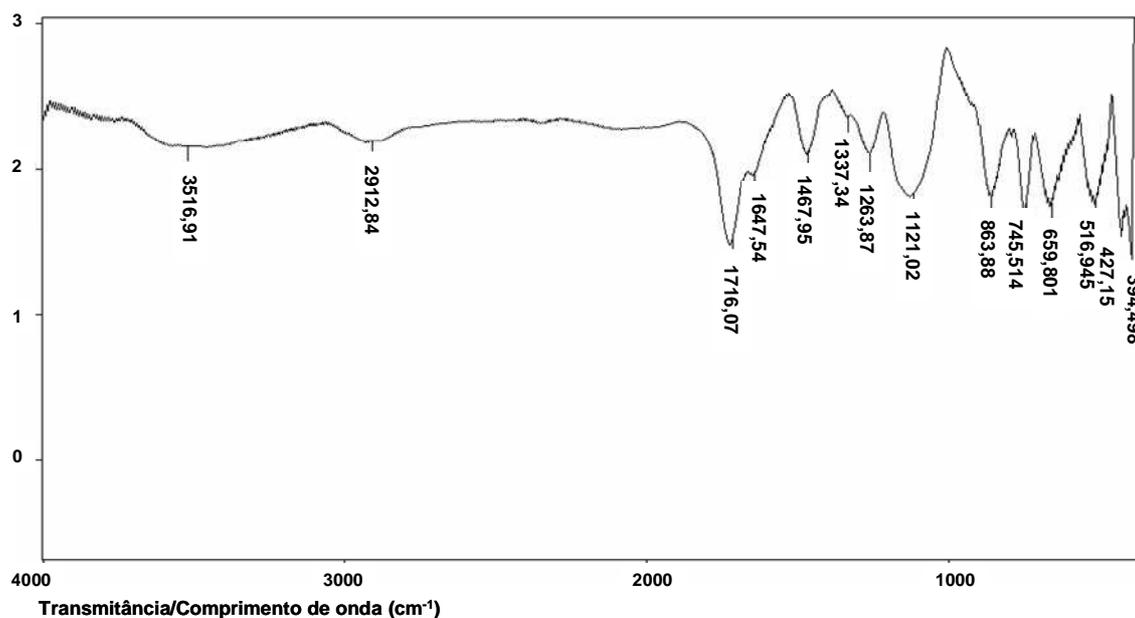


Figura 4.12: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glioxil-EDA após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO_4 , e com EDA.

Tabela 4.10: Frequências vibracionais do suporte-glioxil-EDA após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO_4 , e com EDA.

Frequência (cm^{-1})	Atribuições de deformações
3515	axial N – H
1661	angular N – H
1223	axial C – O – C

Depois das etapas de ativação com glicidol seguido de oxidação e com etilenodiamina, pode-se observar a presença de grupos éter e amino no suporte, atribuídas por suas respectivas frequências (Tabela 4.10).

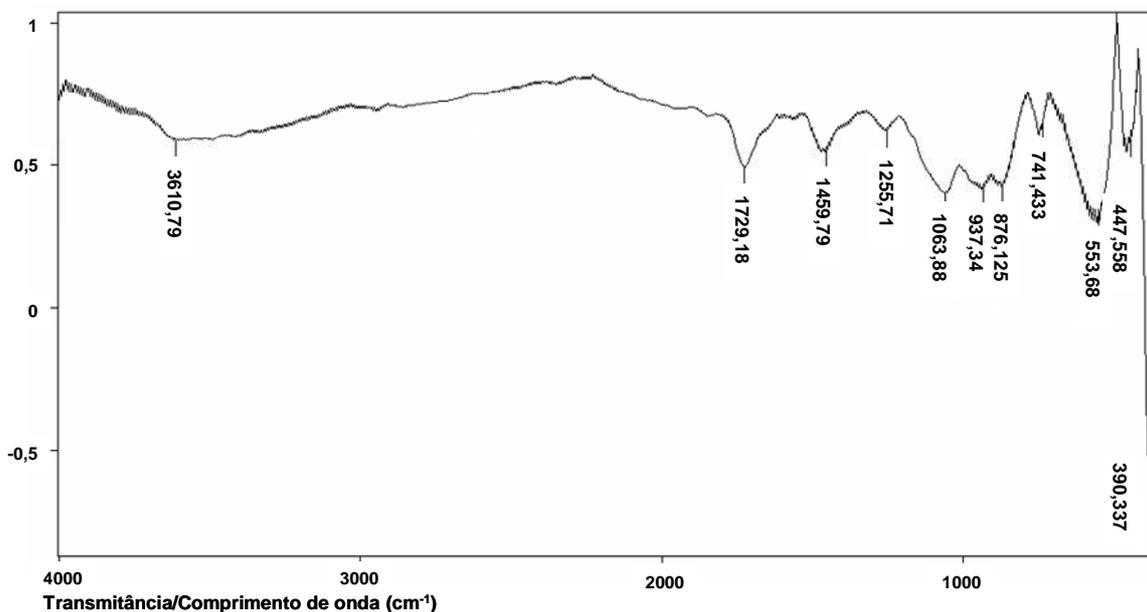


Figura 4.13: Espectros vibracionais de infravermelho em pastilha de KBr para o suporte-glioxil-EDA-glutaraldeído após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO_4 , e com EDA e glutaraldeído.

Tabela 4.11: Frequências vibracionais do suporte-glioxil-EDA-glutaraldeído após a etapa de ativação com glicidol, seguido de oxidação com NaIO_4 , e com EDA e glutaraldeído.

Frequência (cm^{-1})	Atribuições de deformações
3610	axial N – H
1729	axial O = C – H
1459	axial N = C
1063	axial C – O – C

Após a ativação com glicidol, etilenodiamina e glutaraldeído, há formação de base de Schiff e dos grupos aldeído, éter e amino no suporte, da mesma forma verificados pela presença das frequências vibracionais (Figura 4.13) características para

cada grupo funcional (Tabela 4.11). Para este derivado, o rendimento de imobilização foi de $24,45 \pm 1,82$ %, menor que os rendimentos obtidos para Toyopearl-Glioxil-Glutaraldeído e Toyopearl-Glutaraldeído. Com esse derivado, obteve-se um elevado valor de atividade (U/g de suporte), bem como elevado valor de atividade recuperada, $23,77 \pm 3,36$ %. Entretanto, a intensidade da deformação para o grupo aldeído presente neste suporte foi bastante pequena em relação aos outros suportes avaliados. Com base nestes resultados acredita-se que a enzima, ao se ligar ao suporte Glioxil-EDA-Glutaraldeído, sofreu menores distorções em sua estrutura, pois grande parte da enzima ligada ao suporte conservou sua atividade, devido o estabelecimento de ligações efetivas entre a enzima-suporte. A partir destas observações concluímos que o emprego de compostos que aumentam a distância entre a enzima e o suporte (como o EDA e o glutaraldeído) havendo uma diminuição da influência dos efeitos estéricos, o que resultou em um efeito direto no aumento da atividade hidrolítica, dos rendimentos de imobilização, da atividade hidrolítica e da atividade recuperada dos derivados.

Relacionando os resultados obtidos para os parâmetros de imobilização usando Toyopearl para a preparação dos suportes a partir de diferentes estratégias de ativação podemos observar que a atividade catalítica dos derivados obtidos não é proporcional à quantidade de grupos aldeído presentes no suporte durante a imobilização, ela depende de vários outros fatores, como a reatividade dos grupos funcionais presentes no suporte, depende da distância relativa entre esses grupos e da distância entre os grupos terminais e a superfície do suporte, com relação aos efeitos estereoquímicos, além da enzima ficar impedida estericamente ao substrato, ainda temos o efeito na ligação da enzima-suporte. Pode ocorrer efeito de desnaturação quando se liga bastante enzima ao substrato, pois se perde atividade por distorção na molécula.

4.5. Imobilização com alta concentração de proteína

Realizou-se um estudo com imobilizações utilizando diferentes concentrações de proteína. Nestes experimentos foi utilizada uma preparação de CalB, previamente dialisada. A solução dialisada foi utilizada para evitar que as impurezas, proteínas menores que a CalB, atrapalhassem o processo por se ligarem preferencialmente ao suporte, devido ao tamanho pequeno e menor velocidade de difusão no meio. O suporte

selecionado para as imobilizações foi o Toyo-GEG, conforme mencionado anteriormente.

A cada ensaio realizado, foram calculados os parâmetros de imobilização e, de acordo com os resultados obtidos, aumentou-se gradativamente a quantidade de proteína oferecida ao suporte, até que se atingisse a saturação. Utilizaram-se as seguintes concentrações de proteína: 10, 20, 40, 60 e 80 mg/g de suporte. A Figura 4.14 mostra o perfil da atividade hidrolítica do derivado em função da quantidade de proteína oferecida.

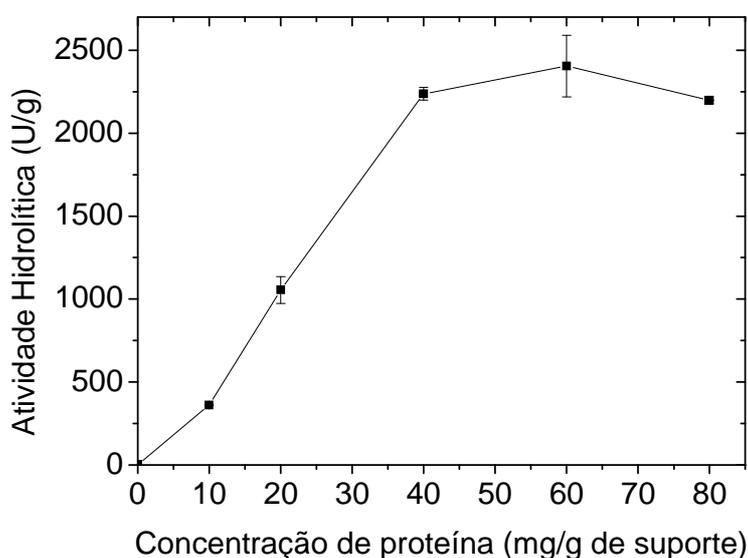


Figura 4.14: Perfil de atividade hidrolítica para diferentes concentrações de proteína, utilizando CALB dialisada, com tempo de imobilização de 6 horas, pH 10, a 25° C.

Esperava-se que os derivados exibissem uma atividade hidrolítica cada vez maior à medida que se aumentasse a quantidade de proteína oferecida ao suporte. No entanto, para uma concentração de 40 mg/g ocorreu saturação do suporte, ou seja, a partir desse valor o aumento da concentração de enzima na solução de imobilização não acarretou em aumentos significativos na atividade do derivado (fazendo considerações com relação ao erro experimental), deste ponto em diante, os valores obtidos para a atividade hidrolítica se estabeleceram em um patamar.

Para uma melhor avaliação da influência da concentração de enzima oferecida, além da atividade hidrolítica do derivado, foram calculados também os seguintes

parâmetros de imobilização: atividade recuperada, rendimento de imobilização e quantidade de proteína ligada (Tabela 4.12).

Tabela 4.12: Parâmetros avaliados na imobilização utilizando diferentes concentrações de proteína, utilizando o suporte Toyo-GEG, com tempo de incubação de 6 horas, pH 10, a 25° C.

Concentração de proteína (mg proteína/g suporte)	Atividade do derivado (U/g)	Atividade recuperada (%)	Rendimento (%)	Proteína ligada (%)
10	360,36 ± 2,08	19,75 ± 0,45	91,91 ± 0,63	51,72
20	1054,55 ± 57,06	4,12 ± 0,11	93,24 ± 0,05	36,24
40	2238,25 ± 27,33	3,91 ± 0,05	99,98 ± 0,00	47,20
60	2405,20 ± 130,99	2,63 ± 0,15	83,36 ± 0,15	33,33
80	2198,83 ± 0,11	1,08 ± 0,00	99,70 ± 0,08	18,83

Através da análise dos dados dispostos na Tabela 4.12, verifica-se que a quantidade de proteína que se liga ao suporte diminui com o aumento da concentração de proteína oferecida para imobilização. A atividade hidrolítica dos derivados aumenta de acordo com o aumento da concentração de proteína, mas atinge um valor constante (dentro da margem do erro experimental), a partir da concentração de 40 mg proteína/g suporte, atingindo assim um patamar de saturação, em torno de 2280, 76 ± 109,5 U/g de suporte.

Outro ponto importante para a constatação do nível de saturação do suporte é o fato da atividade recuperada diminuir com o aumento do oferecimento de proteína ao suporte. Este parâmetro nos fornece uma relação entre a atividade do derivado e a atividade que se esperaria obter no derivado. Alguns fatores podem levar a diminuição da atividade recuperada, como por exemplo, restrições difusionais (efeitos de transferência de massa), pois à medida que a enzima vai se ligando ao suporte fica cada vez mais difícil o acesso das enzimas à superfície do suporte. Com o aumento da concentração de proteína oferecida ocorre a imobilização de moléculas de proteína muito próximas uma das outras, evitando que outras proteínas tenham acesso aos grupos ligantes devido impedimento estérico, o que também leva a redução da atividade por mudanças conformacionais e distorções na estrutura enzimática.

A concentração enzimática oferecida ao suporte para a imobilização covalente é uma das variáveis que controlam a intensidade destas ligações, ou seja, para elevadas concentrações enzimáticas o número de ligações de cada enzima ao suporte tende a reduzir, porém se a concentração de enzima for muito baixa, o elevado número das ligações enzima-suporte pode causar perda de atividade do derivado imobilizado, isto depende também da densidade de grupos ativos na superfície do suporte (Adriano, 2004). Com concentrações mais baixas de enzima, a atividade específica é reduzida por efeitos de distorção na estrutura da enzima na sustentação ao suporte. No entanto, para uma concentração mais elevada, esse efeito é menos severo, mas podem ocorrer limitações difusionais devido a grande quantidade de proteínas ligadas ao suporte, diminuindo sua atividade específica (Cardias, 1996 e Rodrigues *et al.*, 2007).

Os valores de rendimento de imobilização alcançados foram bastante altos, mostrando que praticamente toda enzima oferecida liga-se ao suporte embora não permaneça na forma ativa, devido distorção e/ou superposição, a partir desses resultados podemos concluir a ocorrência do fenômeno de “overcrowded” que é caracterizado pela imobilização das enzimas em multicamadas. Esperavam-se valores maiores para os parâmetros de atividade catalítica, como a atividade recuperada, com o aumento da concentração de enzima oferecida. Estes resultados obtidos mostram que derivados com alta concentração enzimática podem estar sujeitos a limitações difusionais, impedimentos estéricos e desnaturação da estrutura protéica (Gonçalves, 2001 e Yadav e Jadhav, 2005).

4.6. Efeito do tempo de imobilização nas propriedades da enzima imobilizada

Fizeram-se alguns ensaios de imobilização utilizando diferentes tempos de incubação, 6, 12, 24 e 72 horas, para se avaliar a influência do tempo de imobilização nas características funcionais do biocatalisador. Para estes experimentos foi utilizada a preparação comercial de CalB na forma bruta. O suporte utilizado para as imobilizações foi o Toyo-GEG, conforme mencionado anteriormente.

Para todas estas imobilizações, foram calculados os seguintes parâmetros de imobilização: atividade hidrolítica do derivado, atividade recuperada, perda da atividade do branco (alíquota solução de enzima utilizada para imobilização retirada no instante

em que o suporte é colocado em contato com a mesma, e mantida sob as mesmas condições do experimento) e rendimento de imobilização. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.13. Utilizou-se uma concentração de proteína 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL) de suporte, pH 10, a 25° C, vale ressaltar que para o cálculo da atividade recuperada, nesse caso, não foi levada em conta a perda de atividade do branco, pois a sua relevância acarretaria em valores errôneos para os parâmetros atividade recuperada e rendimento de imobilização.

Tabela 4.13: Avaliação de parâmetros na imobilização com diferentes tempos de incubação, utilizando o suporte Toyo-GEG, com concentração de 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL), pH 10, a 25° C.

Tempo de imobilização (horas)	Atividade do derivado (U/g)	Atividade recuperada (%)	Perda de atividade branco (%)	Rendimento (%)
6	$894,17 \pm 43,29$	$2,60 \pm 0,11$	$17,39 \pm 0,11$	$95,68 \pm 0,20$
12	$1897,36 \pm 273,23$	$7,99 \pm 1,11$	$33,12 \pm 1,20$	$96,77 \pm 0,22$
24	$1353,37 \pm 273,77$	$9,87 \pm 2,12$	$55,19 \pm 0,26$	$95,59 \pm 1,35$
72	$1156,87 \pm 32,93$	$5,32 \pm 0,21$	$66,51 \pm 0,95$	$98,75 \pm 0,23$

Através da observação dos resultados obtidos na Tabela 4.13 percebe-se que ao aumentar o tempo de contato da solução de enzima com o suporte de 6 h para 12h, obtém-se um derivado de maior atividade hidrolítica. Para tempos superiores a 12 horas de incubação, a atividade do derivado permanece constante, considerando-se o erro experimental. Houve um aumento da atividade recuperada em função do aumento do tempo de incubação e para o período de imobilização superior a 24 horas esse valor diminuiu sensivelmente.

A capacidade da enzima de fazer ligações permanece constante, ou seja, o processo de imobilização alcança um patamar, mas as interações entre a enzima e o suporte continuam sendo estabelecidas, devido à probabilidade da formação de ligações múltiplas neste valor de pH 10 (Mateo *et al.*, 2000). A obtenção destes resultados deve-se a formação de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte, o que provoca mudanças conformacionais e, conseqüentemente, deformações no sítio ativo da enzima. Imobilizações em pH 10 favorecem a ocorrência de ligações multipontuais e quanto

maior o tempo de incubação, a tendência é ocorrerem cada vez mais interações (Mateo *et al.*, 2007). De acordo com os resultados obtidos, para tempos de imobilização muito grandes, ocorre deformação da enzima devido à formação dessas ligações múltiplas acarretando assim perda da atividade e, também, à perda de atividade da solução sobrenadante no decorrer do processo de imobilização.

A perda na atividade da alíquota de solução de enzima, utilizada para imobilização, retirada no instante em que o suporte é colocado em contato com a mesma mantida sob as mesmas condições do experimento, aumentou linearmente com o aumento nos tempos de incubação. Embora a CalB possua estabilidade em faixas de pH alcalino (7 a 10), o seu pH ótimo de atuação é 7 (Kirk e Christensen, 2002). Observa-se que a enzima sofreu inativação, denotada pela perda de atividade na solução sobrenadante, por permanecer por tempos prolongados nesse valor de pH. Os altos valores obtidos para os rendimentos de imobilização mostram que a desnaturação da enzima em solução não provocou efeito negativo na atividade dos derivados obtidos, pois quantidades semelhantes de enzima (em termos de atividade de sobrenadante) ligaram-se ao suporte.

Na literatura (Pedroche *et al.*, 2006), há relatos da relação direta do aumento das ligações da enzima ao suporte com o acréscimo na estabilidade térmica e operacional dos derivados obtidos, embora os processos de imobilização que envolvam ligações múltiplas resultem em atividades relativamente menores.

Com o estudo de imobilização utilizando diferentes tempos de incubação foram obtidos resultados de atividade hidrolítica comparáveis com os observados nos ensaios realizados utilizando altas concentrações enzimáticas, além do mais, derivados com grande quantidade de enzima imobilizada aumentam a probabilidade de ocorrência de efeito estérico e atraso difusional.

4.7. Ensaios de estabilidade térmica

Realizou-se um estudo de estabilidade térmica em que se fizeram ensaios para a enzima solúvel e para a enzima na forma imobilizada para diferentes temperaturas, 40, 60 e 80° C. Para a enzima imobilizada, fez-se um estudo comparativo entre os dois melhores derivados obtidos variando-se as estratégias de ativação, Toyopearl-EDA-Glioxil-Glutaraldeído (Toyo-GEG) e Toyopearl-Glioxil-Glutaraldeído (Toyo-GG), e a

enzima imobilizada comercial, Novozym 435. O efeito do tempo de incubação (6, 12, 24 e 72 horas) na estabilidade térmica dos derivados também foi avaliado. A estabilidade foi avaliada com relação ao desempenho na hidrólise do PNPB e todos os procedimentos de inativação térmica foram realizados em banho úmido com temperatura de 60°C, pH 7,0. Escolheu-se esse valor de pH por ser o pH ótimo da CalB (Kirk e Christensen, 2002).

4.7.1. Estabilidade térmica da enzima solúvel e enzima imobilizada

Primeiramente foram realizados os ensaios de estabilidade térmica para a enzima solúvel e o derivado Toyo-GEG com tempo de imobilização de 6 horas, nas temperaturas de 40, 60 e 80° C. A Figura 4.15 mostra o perfil da curva de inativação térmica para a enzima solúvel em função do decréscimo da atividade hidrolítica com o tempo.

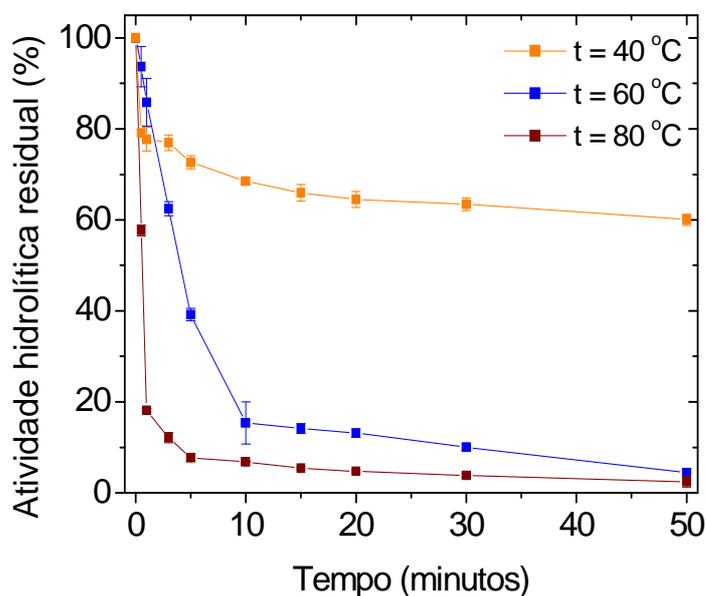


Figura 4.15: Perfis de atividade hidrolítica residual para a lipase do tipo B de *C. antarctica* na forma solúvel, nas temperaturas de 40 (■), 60 (■) e 80° C (■), inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, em banho úmido, atividade hidrolítica de PNPB (15 mM).

Observou-se que para a temperatura de 40° C a atividade hidrolítica decresce mais nos primeiros 5 minutos retendo cerca de 70 % de sua atividade inicial e, após esse período sua atividade residual apresenta um leve decréscimo, para 60° C ocorre o decaimento de maneira acentuada durante os primeiros 10 minutos de incubação, até este ponto a enzima retém cerca de 15 % de sua atividade e para 80° C nos primeiros 2 minutos o decaimento é bastante drástico, retendo menos de 10 % de atividade, no restante do tempo de incubação o decaimento da atividade ocorre de maneira mais suave.

Na Figura 4.16 observam-se as atividades hidrolíticas residuais para o derivado Toyo-GEG, nas temperaturas de 40, 60 e 80° C em função do tempo.

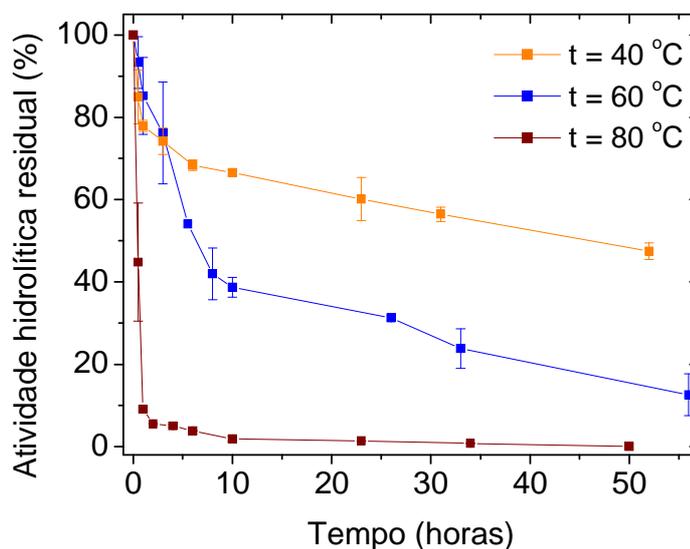


Figura 4.16: Perfis de atividade hidrolítica residual para o derivado Toyo-GEG, nas temperaturas de 40 (■), 60 (■) e 80° C (■), inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, em banho úmido, atividade hidrolítica de PNPB (15 mM).

Para a temperatura de 40° C, nas primeiras 7 horas, observou-se que a atividade hidrolítica decresce mais até reter cerca de 65 % de sua atividade inicial, após esse período sua atividade residual apresenta um decréscimo mais suave, para 60° C o derivado retém cerca de 40 % de sua atividade após 10 horas de incubação e depois continua caindo suavemente, enquanto para a temperatura de 80° C o derivado Toyo-GEG perde quase toda sua atividade para o mesmo intervalo de tempo. As curvas de

inativação térmica, para a enzima solúvel e para o derivado Toyo-GEG, mostraram perfis similares, que sugerem a presença de sub-populações de enzimas que são imobilizadas ao suporte através da ligação de dois ou mais resíduos, ou seja, através de ligação multipontual (Mateo *et al.*, 2000).

A partir dos resultados apresentados na Figura 4.15 e 4.16, concluímos que as curvas de decaimento da atividade hidrolítica apresentaram um perfil exponencial, esta informação foi necessária para a busca de um método que fosse capaz de calcular a constante de desativação térmica (k_d) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) dos biocatalisadores, desta forma, estes parâmetros de estabilidade térmica foram obtidos através do método de ajuste exponencial não-linear cujo procedimento foi previamente descrito no item 3.2.13.1, para a enzima solúvel e para o derivado Toyo-GEG, com exceção destes parâmetros para a temperatura de 40° C para ambos, enzima solúvel e Toyo-GEG, que foram obtidos através do método de ajuste linear cujo procedimento foi previamente descrito no item 3.2.13.2, já que não foi possível a obtenção destes através do método exponencial.

A Tabela 4.14 traz os resultados obtidos para a enzima solúvel (ES) e para a enzima imobilizada (EI), Toyo-GEG, para cada temperatura. Desta forma, foi possível calcular, também, o fator de estabilidade (FE) para os derivados.

Tabela 4.14: Tempos de meia-vida para a enzima solúvel (ES) e para a enzima imobilizada (EI), Toyo-GEG, nas temperaturas de 40, 60 e 80° C, inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, em banho úmido (hidrólise de PNPB 15 mM).

Temperatura (° C)	Tempo de meia vida ES (min)	R ²	Tempo de meia vida EI (horas)	R ²	Fator de estabilidade
40 ^a	97,08	0,777	61,12	0,905	37,78
60 ^b	4,71	0,993	10,49	0,977	133,49
80 ^b	0,57	0,981	0,39	0,989	40,68

a: Método de ajuste linear

b: Método de ajuste exponencial não-linear

O modelo em que se utiliza o ajuste exponencial não-linear utilizando os parâmetros de uma inativação térmica, proposto por Sadana e Henley (1987), se adequou melhor aos dados experimentais, pois foram obtidos R^2 maiores que 0,9.

Observou-se que, para todas as temperaturas, a perda de atividade da enzima solúvel, na temperatura estudada, é superior a da enzima imobilizada, o que nos permite concluir que a imobilização conferiu à lipase uma maior estabilidade térmica. Provavelmente, a ligação covalente ao suporte manteve a enzima em sua forma mais estável mesmo quando submetida a condições adversas de temperatura. A forte interação entre a enzima e o suporte, proporcionada pelo efeito da ligação covalente, pode tornar a molécula enzimática mais rígida e, conseqüentemente, menos sensível aos efeitos do calor (Guisán, 1988 e Fernández-Lafuente *et al.* 1993).

Na temperatura de 40° C não foi possível calcular o tempo de meia vida para enzima solúvel e nem para o derivado através do método de ajuste exponencial não-linear, pois os mesmos no decorrer do experimento não apresentaram atividade residual inferior a 50 %, assim estes parâmetros foram obtidos através do método de ajuste linear. Para esta temperatura tanto ES quanto EI foram obtidos os maiores valores de tempo de meia-vida, porém para este derivado alcançado um menor fator de estabilização dentre as três temperaturas estudadas, ou seja, a imobilização não acarretou um ganho muito significativo na estabilidade da estrutura enzimática.

Para a temperatura de 60° C, para ES e EI foram obtidos valores de tempo de meia-vida um pouco menores, para efeito comparativo, exibiram valores intermediários, porém este derivado exibiu um fator de estabilização maior, 133,49 vezes mais estável do que para a enzima solúvel. Portanto, está temperatura foi escolhida para avaliação de outros parâmetros que influenciam a estabilidade térmica.

Para a condição de temperatura mais drástica, 80° C, ES e EI exibiram os menores valores de tempo de meia-vida, um pouco menores, mas mesmo assim, para esta temperatura, o fator de estabilização da enzima estabilizada ainda foi maior que àquele encontrado para a temperatura de 40° C

A Figura 4.17 apresenta o efeito comparativo do perfil das curvas de inativação térmica para a enzima solúvel e a enzima imobilizada no suporte Toyo-GEG com concentração de proteína de 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL), tempo de imobilização de 6 horas, pH 10, 25° C.

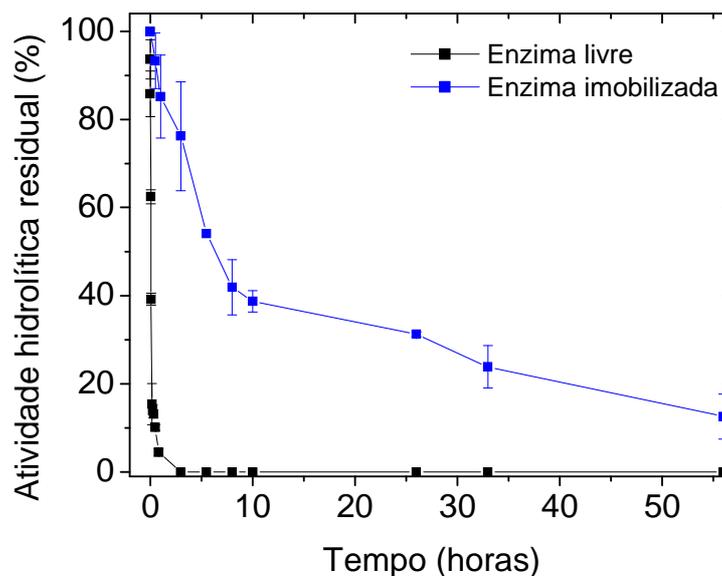


Figura 4.17: Perfil de atividade hidrolítica residual para a enzima solúvel (■) e para a enzima imobilizada (■) suporte Toyo-GEG com uma concentração de proteína de 6mg/g, 6 horas de imobilização, pH 10, 25° C, utilizando preparação comercial bruta, desativação a 60° C em tampão fosfato pH 7, atividade hidrolítica de PNPB (15 mM).

Os perfis de inativação térmica obtidos na Figura 4.17, mostram que o decaimento da atividade para a enzima solúvel é bem mais acentuado que para a enzima imobilizada. Nas primeiras 3 horas, o derivado retém cerca de 80 % da sua atividade inicial enquanto a enzima solúvel já perdeu totalmente sua atividade hidrolítica.

4.7.2. Estabilização térmica dos derivados produzidos *versus* derivado comercial

Os ensaios de estabilidade térmica foram realizados com a enzima imobilizada comercial, Novozym 435 e para os dois melhores derivados (com relação à atividade hidrolítica) obtidos variando-se as estratégias de ativação, Toyopearl-EDA-Glioxil-Glutaraldeído (Toyo-GEG) e Toyopearl-Glioxil-Glutaraldeído (Toyo-GG), ambos com as seguintes condições de imobilização: concentração de 6 mg de proteína/g de suporte, 6 horas de imobilização a pH 10 a 25° C.

Na Figura 4.17 observam-se os perfis das curvas de inativação térmica com as atividades hidrolíticas residuais para os derivados Novozym 435, Toyo-GEG e Toyo-GG em função do decréscimo da atividade hidrolítica com o tempo.

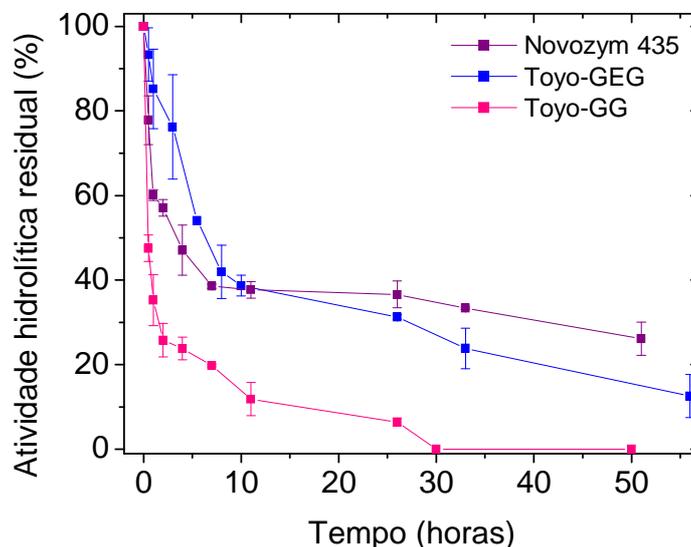


Figura 4.18: Atividade hidrolítica residual para os derivados Novozym 435 (■), Toyo-GEG (■) e Toyo-GG (■) os dois últimos com concentração de proteína de 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL), incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido, atividade hidrolítica de PNPB (15 mM).

Através dos resultados apresentados na Figura 4.17, verificou-se que o derivado Toyo-GEG apresentou um perfil de inativação térmica com decaimento mais suave que os outros derivados, nas primeiras 10 horas. Para esse tempo de incubação, o Novozym 435 e o Toyo-GG retiveram em torno de 37 % e 25 % de sua atividade inicial, respectivamente. Para tempos maiores, o derivado comercial apresentou um decaimento bem mais suave, com perdas menores, comparado aos derivados obtidos em laboratório.

Foi possível calcular as constantes de desativação térmica e os tempos de meia vida, conforme procedimento descrito no item 3.2.13.1, e a partir do tempo de meia vida para a enzima solúvel obtido anteriormente (Tabela 4.14) foi possível calcular, também, o fator de estabilidade (FE) para os derivados. Os resultados podem ser contemplados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Atividade hidrolítica do derivado comercial e para os derivados obtidos a partir da imobilização da CalB utilizando concentração de proteína de 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL) , pH 10, 25° C com tempo de imobilização de 6 horas, e seus respectivos parâmetros de desativação térmica com incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido.

Derivado	Atividade do derivado (U/g)	Tempo de meia vida (horas)	R ²	Fator de estabilidade
Novozym 435	$571,478 \pm 55,47$	4,29	0,945	54,54
Toyo-GEG	$894,17 \pm 43,29$	10,49	0,977	133,49
Toyo-GG	$313,88 \pm 13,20$	0,77	0,931	9,75

Dentre os dois derivados obtidos em laboratório, o melhor resultado de estabilização térmica foi obtido para o Toyo-GEG. O tempo de meia vida e o fator de estabilização para a enzima imobilizada comercial Novozym 435 foram maiores do que para o outros dois derivados produzidos, cerca de 2,45 vezes o valor apresentado para o derivado Toyo-GEG. Segundo Arroyo *et al.* (1999), os agentes de ativação utilizados na preparação dos suportes têm efeito direto na estabilização térmica dos derivados. A estratégia de ativação adotada para este biocatalisador promoveu uma maior estabilização da enzima, provavelmente devido ao uso de etilenodiamina no processo de preparação do suporte (Fernández-Lafuente *et al.* (1993).

4.7.3. Efeito dos diferentes tempos de imobilização na estabilização térmica da enzima imobilizada

Os ensaios de estabilidade térmica foram realizados para o derivado obtido a partir da imobilização no suporte Toyo-GEG, nos tempos de imobilização de 6, 12, 24 e 72 horas. Utilizou-se um derivado com baixa concentração enzimática para observação do efeito isolado da desativação térmica, pois os resultados obtidos para derivados com altas concentrações enzimáticas podem estar superestimados devido ao grande número de enzimas ligas ao suporte. Os perfis das curvas de inativação térmica mostrando as perdas de atividade e as atividades hidrolíticas residuais para os derivados em função do

decréscimo da atividade hidrolítica com o tempo podem ser observados nas Figuras 4.18 e 4.19, respectivamente.

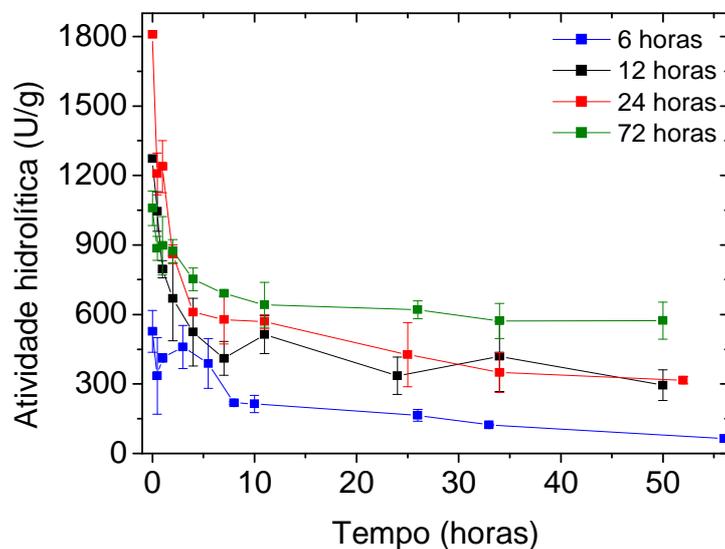


Figura 4.19: Perfis das perdas de atividade hidrolítica para os derivados com tempos de 6 (■), 12 (■), 24 (■) e 72 (■) horas de imobilização em pH 10 a 25° C, para o suporte Toyo-GEG, concentração de proteína de 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL), por inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido.

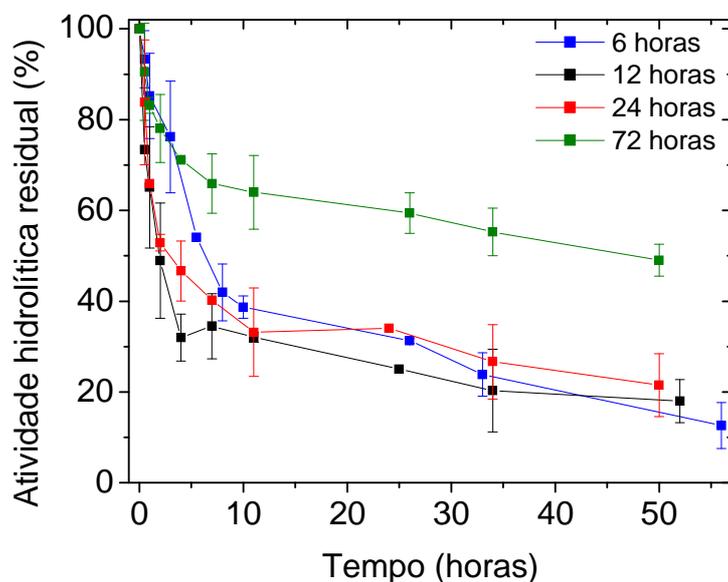


Figura 4.20: Perfis de atividade hidrolítica residual para os derivados com tempos de 6 (■), 12 (■), 24 (■) e 72 (■) horas de imobilização em pH 10 a 25° C, para o suporte Toyo-GEG, concentração de proteína de 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL), inativação térmica por incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido.

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 4.18 e 4.19, foi possível calcular as constantes de desativação térmica e os tempos de meia vida para os derivados, conforme procedimento descrito no item 3.2.13, e a partir do tempo de meia vida para a enzima solúvel obtido anteriormente (Tabela 4.14) foi possível calcular, também, o fator de estabilidade (FE) para os derivados. Os resultados podem ser contemplados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16: Atividade hidrolítica dos derivados obtidos a partir da imobilização da CalB em Toyo-GEG, utilizando concentração de proteína de 6 mg/g ($369,36 \pm 5,57$ U/mL), pH 10, 25° C para os tempos de imobilização de 6, 12, 24 e 72 horas, e seus respectivos parâmetros de desativação térmica com incubação em tampão fosfato pH 7, 60° C em banho úmido.

Tempo de imobilização (horas)	Atividade do derivado (U/g)	Tempo de meia vida (horas)	R ²	Fator de estabilidade
6 ^b	894,17 ± 43,29	10,49	0,977	133,49
12 ^b	1897,36 ± 273,23	2,99	0,963	38,08
24 ^b	1353,37 ± 273,77	4,55	0,954	57,96
72 ^a	1156,87 ± 32,93	129,32	0,623	694,59

a: Método de ajuste linear

b: Método de ajuste exponencial não-linear

Os dados obtidos neste estudo nos mostram um aumento da atividade hidrolítica do derivado com o acréscimo do tempo de imobilização, mas para tempos superiores a 12 horas (24 e 72 horas) ocorrem perdas na atividade, este fato deve-se à enzima fazer ligações multipontuais ao suporte ao invés de realizar ligação unipontual isto confere à lipase uma maior estabilização, provavelmente, a ligação multipontual ao suporte manteve a enzima em sua forma mais estável mesmo quando submetida a condições adversas de temperatura durante longos períodos de exposição. A forte interação entre a enzima e o suporte pode tornar a molécula enzimática mais rígida e, conseqüentemente, menos sensível aos efeitos do calor, embora isso acarrete perdas significativas nas atividades dos derivados (Tardioli *et al.*, 2003). O valor de estabilização para o derivado

obtido para um tempo de imobilização de 72 horas foi maior que o obtido para o derivado comercial, 12,74 vezes.

4.8. Ensaios de estabilidade operacional

A síntese do butirato de butila com rendimento de 90% usando lipase de pâncreas de porco, suportada em material poroso (celite) em hexano, relatada no trabalho de Castro *et al.* (2000) mostra a vantagem do uso de biocatalisadores na síntese de ésteres flavorizantes, por esse motivo para a avaliação da aplicabilidade de um biocatalisador, além da estabilidade térmica, faz-se necessário realizar estudos de estabilidade operacional, que constituem experimentos que comprovem o desempenho do derivado perante reações de síntese.

Para os ensaios de estabilidade operacional foi avaliada a atividade de síntese dos derivados obtidos a partir do suporte Toyo-GEG com tempos de 6 e 72 horas de imobilização, com concentração de 6 mg de proteína/g de suporte, a pH 10 a 25° C. Estes também foram submetidos a ciclos de 24 horas.

Não foi possível a realização de ensaios de síntese para a enzima na forma solúvel devido a aglomeração da CalB através da formação de agregados, este fato deve-se ao pH do meio reacional (ácido butírico, butanol e hexano) ser igual a 5,0, ou seja, valor muito próximo ao pH em que todas as concentrações eletrostáticas da enzima se anulam (ponto isoelétrico) no processo de imobilização. Próximo ao ponto isoelétrico da enzima (pH 6), ponto em que as concentrações totais da enzima são nulas, há uma forte tendência a formação de agregados.

A Figura 4.21 mostra os perfis de conversão ao longo do tempo de síntese do butirato de butila em hexano para o derivado comercial Novozym 435 e os derivados Toyo-GEG com tempos de imobilização de 6 e 72 horas.

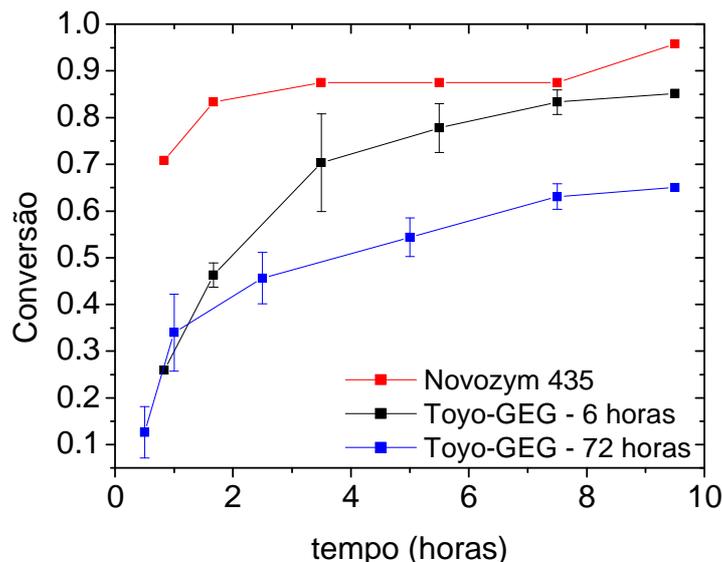


Figura 4.21: Perfis de conversão ao longo do tempo de síntese do butirato de butila em hexano a 25° C para o derivado comercial Novozym 435 (■) e o derivado Toyo-GEG (■), utilizando ácido butírico 0,3 M e n-butanol 0,3 M, pH 5,0.

As curvas de conversão na Figura 4.21 mostram que para o derivado comercial Novozym 435 a síntese do butirato de butila atinge uma alta conversão logo no início da reação, mas a conversão para este derivado é quase constante ao longo da reação, de 85 %, enquanto o derivado Toyo-GEG com tempo de imobilização de 6 horas possui um perfil de conversão crescente ao longo do tempo, até atingir a conversão de 80 % e o derivado com 72 horas de imobilização também possui um perfil de conversão crescente ao longo do tempo, só que atingir a conversão de apenas 60 %. A afinidade da CalB por substratos de cadeia curta contribuiu para os valores de conversão satisfatórios na reação de esterificação do butirato de butila. O derivado Toyo-GEG, com 6 horas de imobilização, leva cerca de 4 horas para atingir a conversão alcançada pelo Novozym 435 em 30 minutos, de 70 %.

Em alguns casos a própria enzima funciona como uma barreira à difusão, devido efeitos estéricos. O impedimento estérico ocorre devido à dificuldade imposta ao substrato já que as enzimas podem estar imobilizadas de tal forma que o seu sítio ativo esteja inacessível. Como o derivado de 72 horas de imobilização as enzimas estão ligadas ao suporte em muitos pontos, devido a imobilização covalente multipontual, ela está menos acessível ao substrato o que acaba prejudicando a conversão por atraso difusional, portanto a velocidade de reação é afetada por limitações difusionais, já que

os substratos precisam vencer uma espécie de barreira para atingir o sítio ativo da enzima (Cardias, 1996).

Deve-se tomar cuidado ao comparar derivados com mais altos valores de atividade hidrolítica obtidos em laboratório com o derivado comercial Novozym 435, pois este derivado foi feito para síntese e não para hidrólise.

Na Figura 4.22 são encontrados os ensaios de estabilidade operacional baseados na conversão utilizando o derivado comercial Novozym 435 e os derivados Toyo-GEG, com tempos de imobilização de 6 e 72 horas, em função do número de ciclos com duração de 24 horas (bateladas consecutivas) de síntese do butirato de butila em hexano a 25° C, utilizando ácido butírico 0,3 M e n-butanol 0,3 M, pH 5,0.

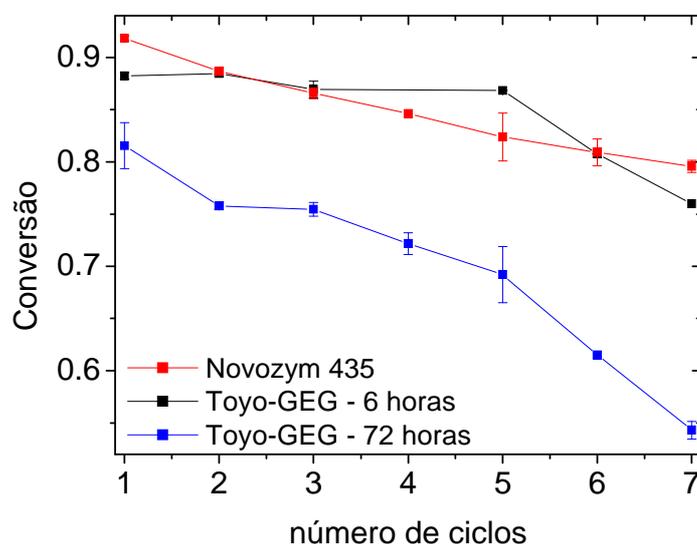


Figura 4.22: Perfil da estabilidade operacional com relação à conversão, baseada em ciclos de síntese de butirato de butila de 24 horas em hexano a 25° C, utilizando ácido butírico 0,3 M e n-butanol 0,3 M, pH 5,0 para o derivado comercial Novozym 435 (■) e o derivado Toyo-GEG (■).

Observou-se que há um decréscimo da atividade enzimática em função do número de bateladas e após sete ciclos de síntese em hexano, o derivado de 6 horas de imobilização manteve 76 % de sua atividade inicial, essa perda de atividade não é muito significativa, pois nas mesmas condições experimentais o derivado comercial reteve apenas 79 % de sua atividade, enquanto isso, o derivado obtido com 72 horas de

imobilização manteve 70 % de sua atividade inicial, após 5 ciclos de síntese, nos ciclos seguintes o derivado apresentou uma perda bastante acentuada, não condizente com os valores de conversão residual anteriores, levando a considerar a ocorrência de perda de massa de derivado.

Outros autores, ao estudarem a imobilização de CalB em diferentes suportes obtiveram resultados de atividade retida de 10 % após sete ciclos em carvão ativado (Rodrigues *et al.*, 2007) e 75 %, em fibra de coco verde, após cinco ciclos (Brígida, *et al.*, 2007), ambos para a síntese do mesmo éster em questão. Estudos realizados para a imobilização de lipase de *C. cylindracea* por adsorção em zeólita Y (Knezevic *et al.*, 1998) e lipase de *C. cylindracea* e de *C. rugosa* por adsorção em óxido de nióbio (Castro *et al.*, 2000) apresentaram grandes perdas de atividade, ambos, para a hidrólise de óleo de palma. Castro *et al.* (2000) após cinco ciclos conseguiu reter apenas 25 % da atividade inicial enquanto Knezevic *et al.* (1998), após sete ciclos, reteve apenas 10 %.

O decréscimo na conversão pode ser atribuído a alterações das condições de hidratação do biocatalisador, afetando a atividade no novo ciclo, bem como à presença de substratos não consumidos e produtos formados (água e éster, por exemplo) na reação anterior (Cao *et al.*, 1999). Estes resultados de estabilidade operacional indicam que além da estabilização da lipase frente à temperatura, devido a sua imobilização por ligação covalente ao suporte, a enzima se tornou mais estável ao efeito do solvente (hexano) e/ou produtos e substratos da reação de síntese do butirato de butila. Rodrigues (2005), obteve para a imobilização de CalB em quitosana-glioxil a retenção de 60 % da atividade inicial após 10 ciclos de síntese do butirato de butila.

5. CONCLUSÃO

A preparação comercial de lipase de *C. antarctica* B na forma solúvel utilizada nos estudos de imobilização para o suporte Toyopearl foi previamente caracterizada através da determinação da sua atividade hidrolítica na hidrólise do PNPB, $2.574,705 \pm 50,56$ U/mL, do teor de proteínas de 10,88 mg de proteína/mL de solução e atividade específica de $238,399 \pm 4,68$ U/mg. O ensaio de eletroforese detectou a presença de outras proteínas além da CalB no extrato enzimático, por este motivo foi necessária a purificação da preparação por método de diálise para o estudo da influência de altas concentrações de proteína na imobilização. A diálise acarretou perda na atividade hidrolítica, de $39,540 \pm 0,22\%$, uma vez que a solução resultante apresentou atividade de $1.546,940 \pm 34,44$ U/mL, concentração de proteína de 1,43 mg/mL, embora o teor relativo de CalB tenha aumentado consideravelmente, atividade específica de $1.083,291 \pm 24,12$ U/mg.

Os dados obtidos para a caracterização morfológica do suporte Toyopearl mostraram a presença de fatores que possibilitam a obtenção de um biocatalisador de alto desempenho, possuindo boa área superficial ($29,7$ m²/g) com diâmetro médio de poro relativamente grande ($690,9$ Å) com relação a CalB, elevada porosidade (volume total de poros de 0.5192 cm³/g) e partículas relativamente uniformes. Este estudo revelou ainda que o suporte empregado é classificado como material macroporoso e portanto toda a sua área superficial está disponível para a CalB.

Espectros de infravermelho mostraram a presença de grupos funcionais presentes no suporte antes e ao final de cada etapa da ativação.

Dentre os cinco suportes preparados a partir de diferentes estratégias de ativação nas seguintes condições de imobilização: concentração de proteína de 6 mg/g, com tempo de incubação de 6 horas, pH 10, 25° C, os derivados que obtiveram um melhor desempenho quanto à atividade hidrolítica foram: Toyopearl-Glioxil-EDA-Glutaraldeído (Toyo-GEG) com $894,17 \pm 43,29$ U/g, Toyopearl-Glioxil-Glutaraldeído (Toyo-GG) com $313,88 \pm 13,20$ U/g e Toyopearl-Glutaraldeído com $235,39 \pm 0,00$ U/g. Fez-se uma comparação entre a enzima imobilizada em Toyo-GEG e o derivado comercial Novozym 435 (CalB imobilizada), cuja atividade hidrolítica foi de $571,478 \pm 55,47$ U/g, medida nas mesmas condições. Observou-se que a atividade hidrolítica do Toyo-GEG foi cerca de 1,56 vezes maior do que a obtida para Novozym 435.

Para se avaliar a capacidade a capacidade do suporte utilizou-se a preparação de CalB, previamente dialisada, em diferentes concentrações de proteína de 10, 20, 40, 60 e 80 mg/g de suporte. Para uma concentração em torno de 40 mg/g ocorreu saturação do suporte com $2238,25 \pm 27,33$ U/g de atividade hidrolítica, ou seja, a partir desse valor o aumento da concentração de enzima na solução de imobilização não acarretou mudanças significativas na atividade do derivado. Observou-se que para baixos concentrações de enzima, a atividade específica é reduzida por efeitos de distorção na estrutura da enzima na sustentação ao suporte, enquanto que para uma concentração mais elevada, esse efeito é menos severo, mas podem ocorrer limitações difusionais devido a grande quantidade de proteínas ligadas ao suporte, diminuindo também a atividade específica.

Na avaliação da influência dos tempos diferentes de incubação no processo de imobilização, utilizaram-se tempos de imobilização de 6, 12, 24 e 72 horas para o suporte Toyo-GEG, com concentração de proteína 6 mg/g de suporte, pH 10, a 25° C. À medida que se aumentou o tempo de contato da solução de enzima com o suporte, obteve-se um derivado de maior atividade hidrolítica, embora, para tempos superiores a 12 horas de incubação tenha ocorrido um decréscimo na atividade. Isto se deve a formação de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte, o que provoca mudanças conformacionais e, conseqüentemente, deformação no sítio ativo da enzima e perda de atividade.

O estudo de estabilidade térmica a 60°C e pH 7,0, foram realizados para a enzima solúvel e a forma imobilizada, a enzima imobilizada apresentou uma maior estabilização com relação à forma solúvel para as temperaturas de 40, 60 e 80° C, sendo que para a temperatura de 60° C obteve-se um fator de estabilidade maior, 133,49 vezes mais estável do que para a enzima solúvel.

Posteriormente, fez-se um estudo comparativo entre os dois melhores derivados, obtidos variando-se as estratégias de ativação, Toyo-GEG e Toyo-GG, e a enzima imobilizada comercial, Novozym 435. Dentre os dois derivados obtidos em laboratório, o melhor resultado de estabilização térmica foi obtido para o Toyo-GEG. O tempo de meia vida e o fator de estabilização para o derivado Toyo-GEG foi maior do que para o outros dois derivados produzidos, cerca de 2,45 vezes o valor apresentado para a enzima imobilizada comercial Novozym 435.

O efeito do tempo de incubação na estabilidade térmica dos derivados também foi avaliado para aqueles obtidos para CalB imobilizada no suporte Toyo-GEG, concentração de proteína de 6 mg/g. Observou-se que quanto maior o tempo de incubação maior a estabilidade térmica a 60° C e atividade hidrolítica exibida pelo derivado, embora tempos de imobilização muito grandes (superiores a 12 horas) impliquem na obtenção de derivados com atividades hidrolíticas menores. A forte interação entre a enzima e o suporte tornou a molécula enzimática mais rígida e, conseqüentemente, menos sensível aos efeitos do calor, apesar disso ter acarretado perdas significativas nas atividades dos derivados nos períodos obtidos após longos tempos de incubação.

Os resultados obtidos para a síntese do butirato de butila em meio orgânico mostraram que, nas condições operacionais adotadas, o biocatalisador comercial Novozym 435 apresentou conversão final ligeiramente maior que o derivado Toyo-GEG, este leva cerca de 4 horas para atingir a conversão alcançada pelo Novozym 435 em 30 minutos, cerca de 70 %. O derivado Toyo-GEG com 6 horas de imobilização possui um perfil de conversão crescente ao longo do tempo, até atingir a conversão de 80 % enquanto a do derivado comercial é quase constante ao longo da reação, em torno de 85 %.

O derivado Toyo-GEG apresentou uma ótima estabilidade operacional para a síntese em meio orgânico retendo a sua conversão inicial em torno de 76 % após 7 ciclos de reação com duração de 24 horas cada, enquanto o derivado comercial Novozym 435 reteve 79 % de sua conversão no ciclo inicial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, W.S. **Estudos da imobilização de penicilina G acilase em quitosana: desenvolvimento de um novo biocatalisador para a produção de antibióticos β -lactâmicos**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2004.

ARROYO, M.; MONTERO, J.M.S.; SINISTERRA, J.V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 3-12, 1999.

BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.

BLANCO, R.M.; CALVETE, J.J.; GUISÁN, J.M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 353-359, 1989.

BHATNAGAR, T.; BOUTAIBA, S.; HACENE, H., CAYOL, J.L.; FARDEAU, M.L., OLLIVIER, B.; BARATTI, J.C. Lipolytic activity from *Halobacteria*: Screening and hydrolase production, **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, p. 133-140, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRÍGIDA, A.I.S.; PINHEIRO, A.D.T.; FERREIRA, A.L.O.; PINTO, G.A.S.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology** (no prelo) 2007.

CABRAL, J.M.S.; KENNEDY, J.F.; NOVAIS, J.M. Investigation of the binding mechanism of glucoamylase to alkylamine derivatives of titanium (IV)-activated porous inorganic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n^o. 5, p. 337-342, 1982.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U.T; SCHMID, R.D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, p. 279–2856, 1999.

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

CASTRO, H.F.; SILVA, M.L.C.P.; SILVA, G.L.J.P. Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n^o. 04-07, p. 849-857, 2000.

CASTRO, H.F.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos, **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n^o. 3, 1997.

CARDIAS, H.C.T. **Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com glutaraldeído**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 1996.

CARDIAS, H.C.T.; GRININGER, C.C.; TREVISAN, H.C.; GUIÁN, J.M.; GIORDANO, R.L.C. Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n^o. 2, p. 141-148. 1999.

CELIA E.; CERNIA, E.; PALOCCI, C. SIMONETTA, S.; TURCHETET, T. Tuning *Pseudomonas cepacea* lipase (PCL) activity in supercritical fluids, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 193-199, 2005.

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

CHEN, J.P. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n^o. 4, p. 404-407, 1996.

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; DELORME, P; WILLEMOT, R. M. Kinetic study of esterefication by immobilized lipase in n-hexane, **FEBS**, v. 276, n^o. 1, p. 181-184, 1990.

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

DIEGO, T.; LOZANO, P.; GMOUH, S.; VAULTIER, M.; IBORRA, J.L. Understanding structure-stability relationships of *Candida antartica* lipase B in ionic liquids, **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1457-1464, 2005.

DUMITRIU E.; SECUNDO F.; PATARIN J.; FECHETE I. Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 119–133, 2003.

FEIRHMAN, A.C. **Avaliação da atividade enzimática de lipases imobilizadas em fluidos pressurizados**, Tese, Universidade Regional Integrada do alto Uruguai e das Missões, Erechim, Brasil, 2005.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; BATISTA, F.; GUISÁN, J.M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, p. 181-189, 1999.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J.M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method, **Enzyme Microbial Technology**, v. 15, n^o. 7, p. 546-550, 1993.

FERREIRA, A.L.O. **Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado**, Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2004.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder, **Catalysis Today**, v. 107, p. 23-30, 2005.

GONÇALVES, L.R.B. **Estudo cinético da síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G-acilase imobilizada em glioxil-agarose**, Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2004.

GUISÁN, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes, **Enzyme Microbial Technology**, v. 10, n.º. 6, p. 375-382, 1988.

GUNNLAUGSDOTTIR, H.; WANNERBERGER, K.; SIVIK, B. Alcoholysis and glyceride synthesis with immobilized lipase on controlled pore glass of varying hydrophobicity in supercritical carbon dioxide, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 360–367, 1998.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOLU, U. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system, **Process Biochemistry**, v. 38, p. 379-386, 2002.

HAN, Y.; SEONG, S.; YING, L.; YING, J.Y. Pressure-driven enzyme entrapment in siliceous mesocellular foam, **Chemical Materials**, v. 18, p. 643-649, 2006.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n.º. 4, p. 390-397, 2002.

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

JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial Lipases, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n^o. 1, p.29, 1994.

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

KNEZ, Z.; HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review, **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, p. 29-42, 2002.

KNEZEVIC, Z.; MOJOVIC, L.; ADNADJEVIC, B. Immobilization of lipase on a hydrophobic zeolite type Y, **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 63, n^o. 4, p. 257-264, 1998.

LEHNINGER, A.L.; COX, M.L.; NELSON, D.L. **Princípios de Bioquímica**. Traduzido por Lodi, W.R.; Simmes, A.A., 4^a edição, Sarvier, São Paulo, 2006.

LOZANO, P.; DIEGO, T.; CARRIÉ, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J.L. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide, **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 214, p. 113–119, 2004a.

LOZANO, P.; VÍLLORA, G.; GÓMEZ, D.; GAYO, A.B.; SÁNCHEZ-CONESA, J.A.; RUBIO, M.; IBORRA, J.L. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide, **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 121-128, 2004b.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1258, p. 272-276, 1995.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40 p. 1451–1463, 2007.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE R.; GUIÓSÁN, 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, n.º. 7, p. 509-515, 2000.

MATSUDA, T.; WATANABE, K.; HARADA, T.; NAKAMURAB, K. Enzymatic reactions in supercritical CO₂: carboxylation, asymmetric reduction and esterification, **Catalysis Today**, v. 96, p. 103–111 ,2004.

MESIANO, J.; BECKMAN, E.J.; RUSSELL, A. Supercritical Biocatalysis. **Chemical Reviews**, p. 623-633, 1999.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO₂, **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, p. 141-148, 2001.

PALOMO, J.M.; FUENTES, M.; LORENTE, G.F.; MATEO, C.; GUIÓSÁN, J.M.; LAFUENTE, R.F. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionally, **Biomacromolecules**, v. 4, n.º. 1 p. 1–6, 2003.

PALOMO, J.M.; LORENTE, G.F.; MATEO, C.; FUENTES, M.; LAFUENTE, R.F.; GUIÓSÁN, J.M. Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (±)-hydroxy-phenylacetic acid derivatives, **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, p. 1337–1345, 2002.

PEDROCHE J.; YUST M. M.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; GUIÓSÁN, J.M., MILLÁN, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of themultipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1160–1166, 2007.

PENCREAC'H, J.; BARATTI, J.C. Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 473 - 479, 2001.

RODRIGUES D.S. **Estudo da imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em carvão ativado e quitosana**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Brasil, 2005.

RODRIGUES, D.S.; CAVALCANTE, G.P.; FERREIRA, A.L.O.; GONÇALVES L.R.B.; Immobilization of *Candida antarctica* lipase type B by adsorption on activated carbon, **Chemical Biochemical Engineering Quarterly**, v. 1, n.º. 22, (no prelo), 2007.

SADANA, A., HENLEY, J.P. Single-Step Unimolecular Non-1st-Order Enzyme Deactivation Kinetics, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n.º. 6, p. 717-723, 1987.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 513 - 521, 1958.

SASAKI, I.; MAKINO, K.; SASAKI, T.T.H. Use of toyopearl as a support for the immobilization of urease, **Journal of Chromatography A**, v. 332, n.º. 20, p. 237-242, 1985.

SCHAGGER, H.; VONJAGOW, G. Tricine sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-kDa to 100-kDa, **Analytical Biochemistry**, v. 2, n.º. 166, p. 368-379, 1987.

SHAH, S.; GUPTA, M.N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n.º. 42, p. 409-414, 2007.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases, **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, J.A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina A**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Brasil, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; BLASSER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994.

SOARES, C.M. F.; CASTRO, H.F.; SANTANA, M.H.A.; ZANIN, G.M. Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in presence of polyethylene glycol, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 863-874, 2002.

SVENDSEN, A.; CLAUSEN, I.G.; PATKAR, S.A.; BORCH, K.; THELLERSEN, M.; Protein engineering of microbial lipases of industrial interest, **Methods in Enzymology**, v. 317, p. 284-340, 1997.

SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMIDT, R. Purification and some properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1124, p. 253 - 261, 1992.

TARDIOLI, P.W.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.; GIORDANO, R. L.C. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase. A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins, **Biotechnology Progress**, v. 19, n^o. 2, p. 565-574, 2003.

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 Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M.T.; PATKAR, S.; JONES, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*, **Structure**, v. 2, n^o. 4, p. 293-308, 1994.

YADAV, S.R.; JADHAV, G.D. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium, **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 86, p. 215-222, 2005.

YADAV, G.D.; LATHI, P.S. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilized lipases, **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 245–252, 2003.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. The effect of water on enzyme action in organic media, **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n^o. 17, p. 8017-8021, 1988.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic-solvents, **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 82, n^o. 10, p. 3192-3196, 1985.

TOSOH BIOSCIENCE LLC

<http://www.separations.us.tosohbioscience.com/Products/ProcessMedia/ByMode/AFC/ToyoparlAF-Amino-650.htm> (Acessado em julho de 2007).

<http://www.separations.us.tosohbioscience.com/Products/ProcessMedia/ByMode/SEC/ToyoparlHW65.htm> (Acessado em julho de 2007).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)