

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RECUPERAÇÃO DE LIPASE BTL-2 DE *Bacillus thermocatenulatus*
PRODUZIDA EM *Escherichia coli* RECOMBINANTE EMPREGANDO
SUPORTES MAGNÉTICOS

Laiane Antunes Lopes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RECUPERAÇÃO DE LIPASE BTL-2 DE *Bacillus thermocatenulatus*
PRODUZIDA EM *Escherichia coli* RECOMBINANTE EMPREGANDO
SUPORTES MAGNÉTICOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.


Mestranda: Laiane Antunes Lopes

Orientador: Profa. Dra. Raquel de L. C. Giordano

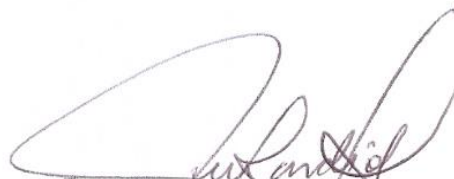
Co-orientador: Dr. Willian Kopp


MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LAIANE ANTUNES LOPES APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 06 DE ABRIL DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:


Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, UFSCar


Willian Kopp
Coorientador, UFSCar


Paulo Waldir Tardioli
UFSCar


Adriano Aguiar Mendes
UNIFAL

*Dedico esse trabalho à minha mãe
Rosângela pelo amor e apoio
incondicional!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder o dom da vida, por ouvir as minhas preces e alimentar o meu espírito.

À minha família: minha mãe Rosângela por apoiar essa minha decisão de ser mestre; pelo amor, carinho e dedicação; ao meu pai Wandick pelo apoio e atenção; meus irmãos Vinícius e Larissa pelo apoio e carinho mesmo distantes.

À Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano, pela oportunidade de cursar o mestrado sob sua orientação, pela atenção, incentivo e conhecimentos compartilhados.

Ao Dr. Willian Kopp agradeço a disposição em co-orientar esse trabalho, pelas sugestões, conhecimentos e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa.

Ao meu namorado Rodrigo por estar ao meu lado sempre que precisei, por me acalmar e me ouvir nos momentos difíceis, por me motivar quando estive desanimada, por tornar os meus dias mais felizes.

Às minhas primas pela amizade e irmandade que supera a distância e por todos os áudios de desabafos compartilhados.

Às minhas companheiras de república pela amizade e longas conversas sobre a vida.

Às amigas de Sanca que vieram com o mestrado, por todos os nossos momentos de distração que aliviaram essa jornada.

Ao Felipe agradeço pela amizade, pelos conhecimentos e por tanto me ajudar no laboratório. À Agnes pela amizade, pelos conhecimentos, conselhos compartilhados e disposição para sempre ajudar! Também aos colegas de Laboratório de Tecnologia Enzimática Vinícius, Margarita, Jéssica, William Costa, Paula e Thaís agradeço pela amizade, companheirismo e disposição.

*“A persistência é o menor caminho
do êxito” (Charles Chaplin)*

RESUMO

Suportes magnéticos têm ganhado atenção, pois a sua separação é relativamente rápida, fácil, de baixo custo e de alta eficiência, podendo purificar e imobilizar biomoléculas em uma única etapa. Lipases são hidrolases que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa. Lipase 2 de *Bacillus thermocatenulatus* (BTL-2) possui propriedades interessantes como estabilidade a altas temperaturas (50 °C), pH alcalino (9,0-11,0) e solventes orgânicos (2-propanol, acetona, metanol) que confere a ela potenciais aplicações industriais. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo purificar e imobilizar a lipase BTL-2 de *Bacillus thermocatenulatus* produzida em *Escherichia coli* recombinante empregando micropartículas magnéticas de sílica (SMMps). Inicialmente foi determinada a melhor condição para a extração da enzima, por influência de tampão, pH e força iônica na etapa de sonicação para rompimento celular. Tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0 se mostrou a melhor condição para a extração da enzima. A adsorção da lipase em SMMp-octil ativada com 100% de grupos octil, foi comparada com adsorção em agarose-octil e sílica-octil. O suporte agarose-octil apresentou o melhor rendimento de adsorção de enzima, 92,9%, e também maior seletividade. SMMp-octil apresentou maior capacidade de adsorção por volume de suporte (189,45 U_{TBU}/mL) do que sílica-octil. Com o intuito de melhorar o desempenho da adsorção da BTL-2 em SMMp, modificou-se então a densidade de grupos octil na superfície do suporte, ativando-o com as porcentagens teóricas de 25%, 50% e 75% de grupos octil. SMMp-octil ativado com 75% de grupos octil se mostrou a melhor condição para a adsorção alcançando rendimento de adsorção de enzima (RA_E) de 92,87% (374,33 U_{TBU}/mL), similar à agarose-octil. A sílica macroporosa comercial (IM S60P) foi selecionada para comparação dos procedimentos de ativação com diferentes densidades de grupos octil (25, 50, 75 e 100%). Obteve-se, para todas as variações de densidade de grupos octil, que a atividade e a proteína adsorvida por volume de suporte foram superiores para o suporte SMMp. Testes de dessorção, contudo, mostraram que era possível dessorver totalmente a enzima de agarose-octil, mas não de SMMp-octil e de sílica-octil. A concentração de Triton X-100 de 0,4% (m/v) foi a melhor concentração para dessorver a enzima dos suportes SMMp-octil 25%, 75% e 100% e a concentração de 0,5% (m/v) foi a melhor concentração para dessorção em SMMp-octil 50%. Presença de carga negativa na sílica promoveu possível interação iônica com a enzima. Testes na presença de debris celulares mostraram maior RA_E (71,25%) para SMMp-octil 75%, comportamento similar ao apresentado pela enzima centrifugada e dialisada, embora com rendimento menor devido à presença de contaminantes. Testes da enzima adsorvida como catalisador mostraram que o derivado SMMp-octil 75% apresentou conversão de 60,93% na síntese de butirato de butila em 24h. Os derivados de BTL-2 adsorvidos diretamente dos debris celulares em SMMp-octil foram utilizados em ciclos e apresentaram conversão satisfatória no primeiro ciclo mas que diminuiu nos ciclos seguintes.

Palavras-chave: lipase BTL-2, purificação, micropartículas magnéticas de sílica, biocatalisadores.

ABSTRACT

Magnetic supports have gained attention because the magnetic separation is easy, has low cost and high efficiency. Moreover, it allows the purification and immobilization of a biomolecules in single step. Lipases are hydrolases that catalyze the hydrolysis and the synthesis of esters from glycerol and long chain fatty acids. Lipase from *Bacillus thermocatenulatus* (BTL-2) has interesting properties such as stability at high temperatures (50 °C), alkaline pH (9.0-11.0) and organic solvent (2-propanol, acetone and methanol). In view of the characteristics that makes BTL-2 a promising lipase for industrial application, concentration and purification is of great importance for implementation in industrial scale. In this context, this study aimed to purify and to immobilize BTL-2 lipase from *Bacillus thermocatenulatus* produced in recombinant *Escherichia coli* using magnetic silica microparticles (SMMPs). Initially, it was determined the best condition for extraction of the enzyme, changing the pH, buffer and ionic strength during the sonication. Sodium phosphate buffer 100 mM pH 8.0 has shown to be the best condition for the enzyme extraction. The adsorption of lipase on SMMP-octyl was compared with the adsorption performed using agarose-octyl and silica-octyl. The agarose-octyl support showed the best enzyme adsorption yield (RA_E), 92.9%, and higher selectivity in the adsorption of the enzyme. The SMMP-octyl showed higher adsorption capacity per volume of support (189.45 U_{TBU}/mL) than silica-octyl. In order to improve the SMMP adsorption performance, it was changed the octyl groups density on the support surface, by activating with theoretical percentages of 25%, 50% and 75% of octyl groups. SMMP-octyl 75%, after activation with 75% of octyl groups, showed to be the best condition, reaching adsorption with RA_E of 92.87% (374.33 U_{TBU}/mL), similar to the obtained using agarose-octyl. The commercial macroporous silica (IM S60P) was also used for comparison of activation procedures with different densities of octyl groups (25, 50, 75 and 100%). The results obtained showed higher activity and the adsorbed protein by support volume with SMMP than silica for all activation degrees. Desorption tests, however, showed to be possible to desorb all enzyme from the agarose-octyl, but not from SMMP and silica-octyl. The presence of negative charges in silica particles, due to possible ionic interaction with the enzyme may be responsible for this result. The concentration of Triton X-100 0.4% was the best concentration to desorb the enzyme of SMMP-octyl 25%, 75% and 100% and concentration of 0.5% (w/v) was the best concentration for desorption in SMMP-octyl 50%. Adsorption tests in the presence of cellular debris were performed and presented similar behavior those ones observed for the centrifuged and dialyzed enzyme solutions: the SMMP-octyl 75% showed higher RA_E (71.25%) in the presence of cellular debris. Esterification reactions, using the adsorbed enzyme on SMMP in different activation degrees as catalysts, showed that the derivative SMMP-octyl 75% allowed reaching 60.93% conversion in butyrate butyl after 24 hours of reaction. The BTL-2 adsorbed derived directly from cell debris in SMMP-octyl were used in recycles and showed satisfactory conversion in the first cycle, however it decreased in the following cycles.

Keywords: lipase BTL-2, purification, silica magnetic microparticles, biocatalysts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Reações catalisadas por lipases28
- Figura 2.2 - Diferentes conformações das lipases. Conformação fechada: a Lid fechada expõe sua face externa (hidrofílica) para o meio de reação protegendo com sua face interna (hidrofóbica) o sítio ativo da lipase (hidrofóbico). Conformação aberta: A Lid se desloca na presença de uma interface água/óleo expondo sua face interna (hidrofóbica) e o sítio ativo da lipase (hidrofóbico).28
- Figura 2.3 - Etapas de um processo genérico de purificação de biomoléculas 34
- Figura 2.4 - Esquema de processo de diálise. (a) Uma solução concentrada é separada por uma membrana de diálise de um grande volume de solvente. (b) Apenas as moléculas menores, em vermelho, se difundem através dos poros membrana até que o sistema atinja o equilíbrio e as moléculas maiores permanecem dentro do sistema. 36
- Figura 2.5 - Estrutura morfológica da sílica com uma camada de organossilano (R = octil) na superfície..... 40
- Figura 2.6 - Esquema geral de purificação de bioprodutos usando partículas magnéticas41
- Figura 2.7 - Adsorção interfacial em suporte hidrofóbico..... 45
- Figura 4.1 - a) Porcentagem de enzima recuperada após sonicação e centrifugação à 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C da biomassa (1 g massa úmida) ressuspendida em 50 mL de tampão a diferentes pHs: citrato de sódio pH 5,0 (100 mM); fosfato de sódio pH 8,0 (10, 50 e 100 mM); pH 6,0 e 7,0 (100 mM); tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 (100 mM). b) Atividade enzimática após sonicação centrifugação nas condições já descritas pelo método da tributirina a pH 7,5, como descrito no item 3.2.1. 63
- Figura 4.2 - Eletroforese SDS-PAGE dos procedimentos de rompimento celular em tampão fosfato pH 8,0 100 mM, centrifugação e diálise. 1- marcador de massa molecular; 2- sobrenadante após centrifugação; 3- sobrenadante após centrifugação e diálise 63
- Figura 4.3 - a) Atividade enzimática de solução de BTL-2 medida em diferentes pHs por hidrólise da tributirina (citrato de sódio 100 mM pH 4,0 e 5,0; fosfato de sódio 100mM pH 6,0; 7,0; e 8,0; tampão carbonato-bicarbonato 100 mM pH 9,0 e 10,0). b) Atividade residual (condição padrão em pH 7,5) em teste de estabilidade da lipase BTL-2 mantida sob agitação a 50 rpm em shaker orbital, 25°C por 16h em diferentes pHs (citrato de sódio 100 mM pH 4,0 e 5,0; fosfato de sódio 100 mM pH 6,0; 7,0 e 8,0; tampão carbonato-bicarbonato 100 mM pH 9,0 e 10,0)..... 65
- Figura 4.4 - Estrutura tridimensional da BTL-2 mostrando os resíduos de aminoácidos carregados positivamente (vermelho) e negativamente (azul). A figura foi modelada a partir da estrutura 2w22 disponível no Protein Data Bank 69
- Figura 4.5 - Influência do tempo de adsorção da BTL-2 em SMMP-octil na proporção 1:10 m/v, pH 7,0 (25 mM), sob agitação a 25°C por 8 h em shaker orbital a 50 rpm. (○) Atividade residual no sobrenadante. (□) Atividade residual no controle; (◇) Proteína total residual no sobrenadante 70
- Figura 4.6 - Influência do tempo de adsorção da BTL-2 em SMMP-amino na proporção 1:10 m/v, pH 7,0 (25 mM), sob agitação a 25°C por 10 h em shaker orbital a 50 rpm. (○)

Atividade residual no sobrenadante. (□) Atividade residual no controle; (◇) Proteína total residual no sobrenadante.	71
Figura 4.7 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos aplicando 20 µL de amostra preparada em tampão de ruptura (1:1 v/v) em cada poço. 1- marcador de massa molecular; 2-controle ao fim do experimento; 3-sobrenadante após adsorção em SMMp; 4-sobrenadante após adsorção em SMMp-octil; 5-sobrenadante após adsorção em sílica-octil; 6-sobrenadante após adsorção em agarose-octil.....	75
Figura 4.8 - Regiões hidrofóbicas na superfície da BTL-2. Em cinza encontram-se os aminoácidos hidrofóbicos diretamente relacionados com a atividade catalítica (Lid e cavidade catalítica) e em azul os demais aminoácidos hidrofóbicos. Na figura é possível visualizar os aminoácidos do sitio ativo (laranja) e duas moléculas de Triton X-100 unidas à cavidade catalítica da enzima (verde)	80
Figura 4.9 - Gráfico da atividade de BTL-2 adsorvida nos suportes agarose-octil, sílica-octil e SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm	80
Figura 4.10 - Gráfico do rendimento de adsorção de BTL-2 nos suportes agarose-octil, sílica-octil e SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm.	81
Figura 4.11 - Gráfico da atividade adsorvida da Lipase BTL-2 (a) e rendimento de adsorção da enzima (b) em SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% nas proporções de 1:10 m/v, 2:10 (m/v) ou 3:10 (m/v); pH 7,0 (5mM), 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. (■) SMMp-octil 25%; (●) SMMp-octil 50%; (▲) SMMp-octil 75%; (◆) SMMp-octil 100%; m.s.: massa seca	85
Figura 4.12 – Gráfico da atividade dessorvida de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25%, 50%, 75% e 100%, variando-se a concentração de Triton X-100 de 0,1% a 0,5% (m/v). Dessorção em pH 7,0 (5 mM), na proporção de 1:10 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-25%; (●) SMMp-octil 50%; (▲) SMMp-octil 75%; (◆) SMMp-octil 100%	88
Figura 4.13 - Gráfico do rendimento de dessorção de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25%, 50%, 75% e 100%, variando-se a concentração de Triton X-100 de 0,1% a 0,5% (m/v). Dessorção em pH 7,0 (5mM), na proporção de 1:10 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-25%; (●) SMMp-50%; (▲) SMMp-75%; (◆) SMMp-100%.	88
Figura 4.14 - Gráfico de atividade dessorvida da Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 0,4% (m/v) com força iônica de 5 mM, 25 mM ou 25 mM acrescido de NaCl 0,5M, na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25°C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-octil 25%; (●) SMMp-octil 50%; (▲) SMMp-octil 75%; (◆) SMMp-octil 100%.	90
Figura 4.15 - Gráfico de atividade dessorvida da Lipase BTL-2 do suporte SMMp-octil 25% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 0,4% (m/v) com tampão fosfato pH 7,0 (25 mM+ NaCl 0,1; 0,25; 0,5 ou 0,75 M, na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25°C por 1h e 30 minutos.	91

- Figura 4.16 - Gráfico de atividade desorvida da Lipase BTL-2 dos suportes sílica-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de desorção contendo Triton X-100 0,2% (m/v) pH 7,0 (5mM), Triton X-100 0,4% (m/v) pH 7,0 (5mM) ou (25mM + NaCl 0,5M), na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25°C por 1h e 30 minutos. (■) Sílica-octil 25%; (●) Sílica-octil 50%; (▲) Sílica-octil 75%; (◆) Sílica-octil 100%. 93
- Figura 4.17 - Gráfico de atividade desorvida da Lipase BTL-2 alcançadas nas melhores condições de desorção dos suportes sílica-octil e SMMP-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de desorção contendo Triton X-100 conforme Tabelas 4.12 e 4.13, na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25°C por 1h e 30 minutos. (□) SMMP-octil; (○) Sílica-octil. 94
- Figura 4.18 - Imagens do procedimento de adsorção da BTL-2 da solução após rompimento celular contendo debris celulares. Neste experimento foi usado SMMP-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 2:10 m/v, 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm e a posterior separação do suporte aplicando-sem campo magnético externo. a) SMMP-octil 100%. b) SMMP-octil 75%. c) SMMP-octil 50%. d) SMMP-octil 25%. e) Solução controle da suspensão de células sem suporte. 97
- Figura 4.19 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMP-octil 25%. 1- marcador de massa molecular; 2-suspensão inicial (controle); 3-suspensão após adsorção; 4-água de lavagem do suporte; 5-suporte após adsorção e lavagem; 6-sobrenadante após desorção; 7- suporte após desorção..... 101
- Figura 4.20 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMP-octil 50%. 1- marcador de massa molecular; 2-suspensão inicial (controle); 3-suspensão após adsorção; 4-água de lavagem do suporte; 5-suporte após adsorção e lavagem; 6-sobrenadante após desorção; 7- suporte após desorção..... 102
- Figura 4.21 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMP-octil 75%. 1- marcador de massa molecular; 2-suspensão inicial (controle); 3-suspensão após adsorção; 4-água de lavagem do suporte; 5-suporte após adsorção e lavagem; 6-sobrenadante após desorção; 7- suporte após desorção..... 103
- Figura 4.22- Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMP-octil 100%. 1- marcador de massa molecular; 2-suspensão inicial (controle); 3-suspensão após adsorção; 4-água de lavagem do suporte; 5-suporte após adsorção e lavagem; 6-sobrenadante após desorção; 7- suporte após desorção..... 104
- Figura 4.23 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMP-octil 25e 50%. 1- marcador de massa molecular; 2- água de lavagem do suporte SMMP-octil 50%; 3- sobrenadante após desorção do SMMP-octil 50%; 4- suporte SMMP-octil 50% após desorção; 5- água de lavagem do suporte SMMP-octil 25%; 6- sobrenadante após desorção do SMMP-octil 25%; 7- suporte SMMP-octil 25% após desorção..... 104

Figura 4.24 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMp-octil 75e 100%. 1- marcador de massa molecular; 2- suporte SMMP-octil 100% após lavagem; 3- sobrenadante após dessorçãodo SMMP-octil 100%; 4- suporte SMMP-octil 100% após dessorção; 5- suporte SMMP-octil 75% após lavagem; 6- sobrenadante após dessorçãodo SMMP-octil 75%; 7- suporte SMMP-octil 75% após dessorção.....	105
Figura 4.25 - Gráfico da atividade recuperada da lipase BTL-2 nos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% medida por hidrólise de (□) tributirina e (○) esterificação.	108
Figura 4.26 - Gráfico da atividade recuperada da lipase BTL-2 nos suportes Sílica-octil 25, 50, 75 e 100% medida por hidrólise de (□) tributirina e (○) esterificação.	110
Figura 4.27 - Gráfico do efeito do tempo na conversão em ésteres utilizando atividade fixa de 1000 U _{EST} empregando BTL-2 Livre e imobilizada em SMMp-Octil 25, 50, 75 e 100% em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; 4h.; (□) SMMp-Octil 100%; (◇) SMMp-Octil 75%; (Δ) SMMp-Octil 50%; (*) SMMp-octil 25%.	112
Figura 4.28 - Gráfico da atividade recuperada da lipase BTL-2 adsorvida diretamente dos debris celulares nos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% medida por (□) tributirina e (○) esterificação esterificação.....	114
Figura 4.29 - Gráfico da influência do tempo na esterificação utilizando 1g de BTL-2 imobilizada por adsorção direta na presença de debris nos diferentes suportes SMMp-Octil 25, 50, 75 e 100% e 1 g (massa seca) do derivado Lipozym em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; 24h. (○) SMMp-Octil 100%; (□) SMMp-Octil 75%; (◇) SMMp-Octil 50%; (Δ) SMMp-Octil 25%; (*) Lipozym.	115
Figura 4.30 - Gráfico da influência do tempo de esterificação utilizando BTL-2 Livre (concentrada 3x.) em dois volumes diferentes: 0,500 mL (○) e 1 mL (□) em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; 24h.....	116
Figura 4.31 - Dados do Reuso da BTL-2 imobilizada por adsorção direta na presença de debris celulares nos diferentes suportes SMMp-Octil 25, 50, 75 e 100% e 1 g (massa seca) e do derivado Lipozym em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; por 5 ciclos de 24h cada.....	117
Figura 4.32 - Gráfico do RD _E de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 75% e 100%, variando-se a concentração de Triton X-100 de 0,1% a 1,2% (m/v). Dessorção em pH 7,0 (5 mM), na proporção de 1:10 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-75%; (●) SMMp-octil 100%	120
Figura 4.33 - Gráfico da atividade dessorvida de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 75% e 100%, variando-se a concentração de Triton X-100 de 0,1% a 1,2% (m/v). Dessorção em pH 7,0 (5 mM), na proporção de 1:5 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-75%; (●) SMMp-octil 100%	121
Figura 4.34 - Gráfico da atividade dessorvida de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 75% e 100%, usando Triton X-100 1,0% (m/v). Dessorção em tampão fosfato (5 mM),	

na proporção de 1:5 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) pH 5,0; (■) pH 7,0; (■) pH 9,0 122

Figura 4.35 - Gráfico do RDE de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 75% e 100%, usando Triton X-100 1,0% (m/v). Dessorção em tampão fosfato (5 mM), na proporção de 1:5 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) pH 5,0; (■) pH 7,0; (■) pH 9,0 122

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1 - Adsorção da lipase BTL-2 em SMMp-octil na proporção de 1:10 m/v, força iônica de 25 mM, por 16 h sob agitação em shaker orbital a 50 rpm e 25° C. Controle T_f: solução enzimática sem o suporte nas mesmas condições de adsorção após 16 h. At_{Te}: atividade teórica adsorvida no suporte. Pt_{Te}: proteína teoricamente adsorvida no suporte. R_{AE}: rendimento de adsorção da enzima. R_{AP}: rendimento de adsorção da proteína. AE₀: atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD}: atividade específica teórica no derivado..... 66
- Tabela 4.2 - Adsorção da lipase BTL-2 em SMMp-amino na proporção de 1:10 m/v, força iônica de 25 mM, por 16 h sob agitação em shaker orbital a 50 rpm e 25° C. Controle T_f: solução enzimática sem o suporte nas mesmas condições de adsorção após 16h. At_{Te}: atividade teoricamente adsorvida no suporte. Pt_{Te}: proteína teoricamente adsorvida no suporte. R_{AE}: rendimento de adsorção da enzima. R_{AP}: rendimento de adsorção da proteína. AE₀: atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD}: atividade específica teórica no derivado..... 68
- Tabela 4.3 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp e sílica sem recobrimento, SMMp-octil, e sílica-octil e agarose-octil na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea}: atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea}: proteína teórica adsorvida. R_{AE}: rendimento de adsorção da enzima. R_{AP}: rendimento de adsorção da proteína. AE₀: atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD}: atividade específica teórica no derivado..... 73
- Tabela 4.4 - Dados da dessorção da Lipase BTL-2 dos suportes SMMp, sem recobrimento, SMMp-octil, e sílica-octil e agarose-octil utilizando Triton X-100 0,2 % (m/v), pH 7,0 (5 mM), na proporção de 1:10 m/v sob agitação a 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. R_{DE}: rendimento de dessorção de enzima. R_{DP}: rendimento de dessorção de proteína. AE₀: atividade específica no controle ao final do processo. AE_f: atividade específica no sobrenadante dessorvido. 77
- Tabela 4.5 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea}: atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea}: proteína teórica adsorvida. R_{AE}: rendimento de adsorção da enzima. R_{AP}: rendimento de adsorção da proteína. AE₀: atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD}: atividade específica teórica no derivado..... 78
- Tabela 4.6 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 25% nas proporções de 1:10 m/v, 2:10 (m/v) ou 3:10 (m/v); pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea}: atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea}: proteína teórica adsorvida. R_{AE}: rendimento de adsorção da enzima. R_{AP}: rendimento de adsorção da proteína. AE₀: atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD}: atividade específica teórica no derivado 82
- Tabela 4.7 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 50% nas proporções de 1:10 m/v, 2:10 (m/v) ou 3:10 (m/v); pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea}: atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea}: proteína teórica adsorvida. R_{AE}: rendimento de adsorção da enzima. R_{AP}: rendimento de adsorção da proteína. AE₀:

	atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado	83
Tabela 4.8	- Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 75% nas proporções de 1:10 m/v e 2:10 (m/v); pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado	83
Tabela 4.9	- Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 100% nas proporções de 1:10 m/v, 2:10 (m/v) ou 3:10 (m/v); pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado	84
Tabela 4.10	- Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 75% na proporção de 1:20 m/v, pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado.....	86
Tabela 4.11	- Adsorção da Lipase BTL-2 em sílica-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado.....	87
Tabela 4.12	- Dados das maiores atividades de dessorção da Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. RD_E : rendimento de dessorção de enzima. RD_P : rendimento de dessorção de proteína. FP : Fator de purificação.....	89
Tabela 4.13	- Dados das maiores atividades de dessorção da Lipase BTL-2 dos suportes sílica-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. RD_E : rendimento de dessorção de enzima. RD_P : rendimento de dessorção de proteína.	93
Tabela 4.14	- Dados de adsorção da BTL-2 da solução após rompimento celular contendo debris celulares em suspensão usando SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 2:10 m/v, 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado.....	98
Tabela 4.15	- Dados da dessorção da Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando Triton X-100 0,4 % (m/v) (SMMp-octil 75 e 100%) e mesma solução com NaCl 0.25M (SMMp-octil 25 e 50%), na proporção de 2:10 m/v sob agitação	

	à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. RD _E : rendimento de dessorção de enzima. RD _P : rendimento de dessorção de proteína.	100
Tabela 4.16	- Atividade de esterificação: da BTL-2 livre utilizando amostra concentrada 3x; BTL-2 imobilizada em agarose-octil, sílica-octil e SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% (massa úmida); Lipozyme (derivado comercial) (massa seca). Reação a 300 rpm, 37°C a partir de 0,1M 1-butanol e 0,1M ácido butírico em heptano por 5 min...	107
Tabela 4.17	- Dados de atividade recuperada da lipase BTL-2 em agarose-octil medidos por atividade hidrólise de tributirina e esterificação. AR: Atividade Recuperada.....	110
Tabela 4.18	- Dados da conversão de esterificação utilizando atividade fixa de 1000 U _{EST} empregando BTL-2 Livre e imobilizada em SMMp-Octil 25, 50, 75 e 100% em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; 4h.....	112
Tabela 4.19-	Atividade de esterificação: BTL-2 adsorvida em SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% (massa úmida) direto de debris celulares; Lipozyme (derivado comercial) (massa seca). Reação à 300 rpm, 37°C a partir de 0,1M 1-butanol e 0,1M ácido butírico em heptano por 5 min.	113
Tabela 4.20	- Adsorção da Lipase BTL-2 dialisada em SMMp-octil 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At _{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt _{Tea} : proteína teórica adsorvida. R _{AE} : rendimento de adsorção da enzima. R _{AP} rendimento de adsorção da proteína. AE ₀ : atividade específica no controle ao final do processo. AE _{TD} : atividade específica teórica no derivado...	119
Tabela 4.21	- Dados de adsorção da BTL-2 da solução após rompimento celular contendo debris celulares em suspensão usando SMMp-octil 75% e 100% na proporção de 1:10 m/v, 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At _{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt _{Tea} : proteína teórica adsorvida. R _{AE} : rendimento de adsorção da enzima. R _{AP} rendimento de adsorção da proteína. AE ₀ : atividade específica no controle ao final do processo. AE _{TD} : atividade específica teórica no derivado.....	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Classificação das enzimas conforme tipo de reação	25
Quadro 2.2 - Aplicações industriais das lipases	29
Quadro 2.3 - Operações Unitárias do processo de purificação de produtos biotecnológicos ..	35
Quadro 2.4 - Classificação dos suportes.....	39

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A_{t0}	Atividade no controle ao final da adsorção
A_{tf}	Atividade no sobrenadante ao final da adsorção
AE_0	Atividade específica no controle ao final da adsorção
AE_f	Atividade específica no sobrenadante dessorvido
AE_{TD}	Atividade específica teórica no derivado
AR	Atividade Recuperada
A_{tTea}	Atividade teórica adsorvida
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
BTL-2	Lipase 2 de <i>Bacillus thermocatenuatus</i> expressa em <i>E. coli</i>
DEAE	Dietilaminoetanol
FP	Fator de purificação
IDA	Ácido iminodiacético
OCTEO	Trietoxi(octil)silano
PEI	Poliétilenoimina
P_{tTea}	Proteína teórica adsorvida
<i>p</i> -NPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenila
RA_E	Rendimento de adsorção de enzima
RA_P	Rendimento de adsorção de proteína
RD_E	Rendimento de dessorção de enzima
RD_P	Rendimento de dessorção de proteína
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SMMp	Micro-partículas magnéticas de sílica porosa
SPION	Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro
TBU	Tributirina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1	Proteínas: Enzimas	24
2.2	Lipases.....	26
2.2.1	Lipase BTL-2	29
2.3	Purificação e Recuperação de produtos biotecnológicos	32
2.4	Diálise.....	36
2.5	Adsorção.....	37
2.5.1	Adsorção por troca iônica.....	37
2.5.2	Adsorção por interação hidrofóbica	37
2.6	Suportes para adsorção	38
2.7	Suportes Magnéticos	40
2.8	Imobilização de Lipases	43
3	MATERIAS E MÉTODOS	47
3.1	Materiais	47
3.1.1	Enzimas	47
3.1.2	Suportes	47
3.1.3	Reagentes, sais, solventes, consumíveis diversos	47
3.2	Métodos Analíticos.....	48
3.2.1	Hidrólise da Tributirina	48
3.2.2	Atividade de Esterificação.....	48
3.2.3	Determinação de proteínas totais	49
3.3	Procedimentos Experimentais	50
3.3.1	Obtenção da Enzima.....	50
3.3.2	Diálise.....	50
3.3.3	Concentração	50
3.3.4	Estudo da Influência do pH na Extração da Enzima Durante a Etapa de Rompimento Celular	51
3.3.5	Avaliação da Estabilidade e Atividade Enzimática em Função do pH	51
3.3.6	Síntese de Micropartículas Magnéticas de Sílica (SMMps) e Modificação da Superfície.....	51
3.3.6.1	Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro (SPION).....	52

3.3.6.2	Síntese de Micropartículas Magnéticas de Sílica (SMMps)	52
3.3.7	Modificação da Superfície das SMMps e Sílica com Grupos Octil e Amino	52
3.3.8	Estudo da Adsorção de BTL-2 em SMMps ativados com diferentes grupos funcionais	53
3.3.9	Cálculo de rendimento de adsorção.....	54
3.3.10	Cinética de adsorção de BTL-2 em SMMps ativadas com grupos amino e octil	54
3.3.11	Adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos.....	55
3.3.12	Dessorção de BTL-2 de diferentes suportes hidrofóbicos.....	55
3.3.13	Cálculo de rendimento de dessorção	56
3.3.14	Adsorção de BTL-2 em SMMp e Sílica com diferentes densidades de grupos octil	56
3.3.15	Dessorção de BTL-2 Adsorvida em SMMp e Sílica com Diferentes Densidades de Grupos Octil	56
3.3.16	Eletroforese SDS – PAGE.....	57
3.3.17	Adsorção de Lipase BTL-2 na Presença de Debris Celulares.....	58
3.3.18	Avaliação de SMMp como Suporte para Imobilização da Lipase BTL-2	59
3.3.19	Reação de Esterificação.....	60
3.3.20	Estudo da adsorção de BTL-2 em SMMp-octil 75% e 100% na presença de etanol.....	61
4	RESULTADOS	62
4.1	Influência do pH na Extração da Enzima.....	62
4.2	Avaliação da Estabilidade da Lipase BTL-2 em Diferentes Valores de pH	64
4.3	Estudo da Adsorção em SMMps Ativados com Diferentes Grupos Funcionais.....	65
4.3.1	Estudo da influência do pH na Adsorção em SMMp-octil	65
4.3.2	Estudo da influência do pH na adsorção em SMMp-amino.....	67
4.3.3	Influência do Tempo na Adsorção	69
4.4	Adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos.....	71
4.4.1	Dessorção da BTL-2 em Diferentes Suportes Hidrofóbicos.....	75
4.5	Adsorção de BTL-2 em SMMp Ativado com Diferentes Densidades de Grupos Octil	78
4.5.1	Variação da massa de suporte SMMp-octil na adsorção de BTL-2.....	81
4.6	Adsorção de BTL-2 em Sílica com Diferentes Densidades de Grupos Octil	86
4.7	Estudo da Dessorção da BTL-2 de SMMp-octil	87
4.8	Estudo da Dessorção da BTL-2 de Sílica-octil	92
4.9	Purificação de BTL-2 em uma única etapa	95
4.10	Imobilização de BTL-2 em SMMps.....	106

4.10.1	Imobilização da lipase BTL-2 dialisada em diferentes suportes hidrofóbicos.....	106
4.11	Imobilização da lipase BTL-2 em uma única etapa	112
4.12	Estudo da adsorção de BTL-2 em SMMp-octil 75% e 100% na presença de etanol	117
5	CONCLUSÕES	123
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	124
7	REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

O interesse crescente por processos de purificação de biomoléculas deve-se principalmente ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

A aplicação de biocatalisadores na indústria tem sido objeto de muitos estudos (DALLA VECHIA et al., 2004). As limitações existentes associadas ao uso de catalisadores químicos são a baixa especificidade, pois geralmente fornecem produtos de composição química mista ou produtos contaminados e geram efluentes tóxicos (MENDES et al., 2011).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente e entre os processos de maior interesse em que as enzimas são potenciais catalisadores estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases (DE CASTRO et al., 2004). As aplicações industriais das lipases são nas indústrias de detergentes, farmacêuticas, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais (JEGER; REETZ, 1998).

Bacillus thermocatenulatus é um microrganismo termofílico que produz duas lipases de diferentes tamanhos: BTL-1 (16 kDa) e BTL-2 (43 kDa). Ambas apresentam alta estabilidade térmica, alta estabilidade em valores de pH alcalinos (9,0-11,0) e em diferentes solventes orgânicos (PALOMO et al., 2004a).

Em trabalho realizado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ-UFSCar) o gene da lipase BTL-2 de *B. thermocatenulatus* foi clonado em *Escherichia coli* (linhagem BL321) sob controle do promotor λ PL, que permitiu a indução na produção da enzima através de choque térmico. As condições de indução mais promissoras foram identificadas e realizadas em cultivo de batelada alimentada num biorreator de 2 litros (VÉLEZ et al., 2013).

Tendo em vista as características que fazem da BTL-2 uma lipase promissora para aplicação em indústrias, o próximo passo então seria concentrar e purificar essa lipase para que ela esteja disponível em concentrações em nível industrial.

Para viabilizar a aplicação de enzimas em aplicações industriais, são necessárias técnicas eficientes para o isolamento a partir de uma cultura de produção microbiana ou extratos vegetais/animais, de modo a satisfazer o grau de pureza desejado para o produto final (LINKE; BERGER, 2011). Processos tradicionais de purificação de proteínas podem compreender um elevado número de etapas com diferentes técnicas de concentração e purificação. A maior quantidade de operações de separação para melhorar o grau de pureza pode ocasionar perda da

atividade enzimática a cada etapa além de aumentar o custo do processo e do produto final (LIMA, 2001).

Suportes magnéticos têm ganhado atenção devido às suas propriedades, que poderiam ter aplicações promissoras no isolamento e separação de proteínas, enzimas e outros agentes bioativos em bioquímica, medicina e biotecnologia. Separação magnética é relativamente rápido, fácil, de baixo custo e de alta eficiência. (WANG *et al.*, 2009)

A natureza magneticamente sensível de tais partículas adsorventes permite a sua manipulação seletiva, ou seja, a sua separação na presença de outras partículas sólidas em suspensão. Assim, torna-se possível separar magneticamente moléculas-alvo selecionadas diretamente de caldos de fermentação, plasma, leite, soro de leite e extratos de plantas, por exemplo, simplesmente ligando-os em adsorventes magnéticos antes da aplicação de um campo magnético. Ao utilizar a separação magnética, as diversas fases de pré-tratamento da amostra (especialmente centrifugação, filtração e separação de membrana), que normalmente são necessários podem ser eliminadas. (FRANZREB *et al.*, 2006).

Em busca de materiais promissores para a purificação e imobilização de enzimas foi desenvolvido no DEQ-UFSCar, em parceria com pesquisadores do Departamento de Física da UFSCar, um processo para a síntese de um novo suporte magnético com características adequadas para aplicação em bioprocessos, que teve pedido de patente depositado em 2014. As micropartículas magnéticas de sílica (SMMps) foram sintetizadas por Kopp (2013) em microemulsão água-em-óleo, empregando silicato de sódio como fonte de sílica e nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro como núcleo magnético. Os materiais obtidos apresentaram excelentes propriedades, tais como alta magnetização de saturação, forte resposta a campos magnéticos, alta área superficial e baixo custo (KOPP *et al.*, 2015).

O revestimento de sílica permite funcionalização da micropartícula com grupos adequados para cada aplicação visada. BTL-2 possui alta afinidade por substratos hidrofóbicos. A literatura relata a purificação bem sucedida de BTL-2 através de agarose ativada com grupos hidrofóbicos (PALOMO *et al.*, 2004a; CARRASCO-LÓPEZ *et al.*, 2008; VOLPATO *et al.*, 2010). Há indicação assim de necessidade de ativação de SMMps com grupos hidrofóbicos para a sua utilização na recuperação/purificação de lipase BTL-2. Se bem sucedido, a utilização de SMMps iria permitir purificar e imobilizar a lipase em uma única etapa.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo principal estudar a purificação e imobilização da lipase BTL-2 de *Bacillus thermocatenuatus* produzida em *Escherichia coli* recombinante por adsorção em SMMps atentando-se às interações hidrofóbicas e às características da lipase.

Este trabalho teve ainda como objetivos específicos:

- a. Obter lipase BTL-2 a partir da biomassa proveniente do cultivo de *E. coli* recombinante determinando as melhores condições de extração;
- b. Testar SMMps funcionalizadas com diferentes grupos e sob diferentes condições de pH visando selecionar as condições mais eficientes para a adsorção da enzima;
- c. Determinar as condições de máxima dessorção da enzima para os suportes testados;
- d. Testar o uso dos suportes para purificação/imobilização da enzima diretamente da suspensão celular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Proteínas: Enzimas

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células animais e a segunda macromolécula mais abundante em células vegetais (LEHNINGER et al., 2002). Elas ocorrem em grande variedade de forma e tamanho, milhões de proteínas diferentes podem ser encontradas em uma única célula. As proteínas são constituídas principalmente por vinte diferentes aminoácidos que quando unidos covalentemente em sequências lineares se enovelam em estruturas tridimensionais específicas obtendo diferentes características e funções. O fato de cada proteína ter uma função química ou estrutural específica está diretamente ligado à sua estrutura tridimensional (LEHNINGER et al., 2002; VOET et al., 2014). As proteínas exercem diferentes funções nos organismos vivos como funções catalíticas (ex. quimotripsina, tripsina); função de transporte (ex. hemoglobina, lipoproteína); função nutricional e/ou reserva de nutrientes (ex. albumina, caseína); função de defesa imunológica ou ambiental (ex. imunoglobina, trombina); função estrutural (ex. colágeno, elastina, queratina); função de movimento micro e macromolecular (ex. actina, miosina, tubulina) e função de regulação (insulina, hormônio crescimento, repressores) (LEHNINGER et al., 2002; VOET et al., 2014).

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos na grande maioria das reações bioquímicas realizadas pelos organismos vivos. Elas se diferenciam dos catalisadores químicos pelo seu alto grau de especificidade pelo substrato e por atuarem em soluções aquosas sob condições brandas de temperatura, pressão e pH (LEHNINGER et al., 2002; VOET et al., 2014). Entre as reações catalisadas por enzimas estão uma série de transformações químicas muito complexas entre macromoléculas biológicas, muitas delas realizadas de forma sequencial e cineticamente controlada, que não estariam acessíveis a métodos convencionais da química orgânica (GUISÁN, 2006). As reações catalisadas por enzimas possuem geralmente velocidades na ordem de 10^6 a 10^{12} vezes maiores do que as correspondentes reações não catalisadas e várias ordens de grandeza maiores do que as mesmas reações catalisadas quimicamente (VOET et al., 2014).

No início do século XX, as enzimas foram identificadas como as responsáveis pelos processos fermentativos e sua composição e estrutura química começaram a ser tema de investigação. O conhecimento resultante levou à utilização das enzimas como catalisadores biológicos em uma variedade de outros campos, como nas indústrias têxtil, farmacêutica, e indústrias químicas (GUISÁN, 2006).

Biocatalisadores têm sido comumente utilizados em muitas aplicações industriais. O uso de enzimas em lugar de catalisadores químicos tem se mostrado uma opção interessante para processos industriais principalmente devido a questões ambientais (SILVA, 2012b). A razão principal é que os catalisadores químicos mostram várias desvantagens, são pouco versáteis, exigem altas temperaturas para atingir alta velocidade de reação, possuem baixa especificidade, fornecem produtos de composição química mista ou produtos contaminados que requerem uma etapa posterior de purificação, bem como produzem uma grande variedade de subprodutos e efluentes tóxicos (MENDES et al., 2011b).

Enzimas se tornam catalisadores atrativos para o uso industrial devido, principalmente, a suas características de alta eficiência catalítica, alto grau de especificidade frente ao substrato e capacidade de acelerar reações químicas específicas sem a formação de subprodutos indesejáveis, em condições suaves de síntese, (DALLA-VECCHIA et al., 2004). No entanto, as enzimas são adaptadas para exercerem suas funções nos seres vivos e logo existem empecilhos para o uso em reatores industriais. Algumas características que não são adequadas para aplicações industriais: as enzimas são catalisadores solúveis e geralmente instáveis, elas podem ser inibidas por substratos e produtos, funcionando bem, em muitos casos, somente com substratos naturais e sob condições fisiológicas (GUISÁN, 2006).

As enzimas são classificadas conforme o tipo de reação que catalisam. Há seis classes principais de reações enzimáticas conforme a Quadro 2.1 (VOET et al., 2014). As enzimas hidrolíticas (ex.: proteases, celulasas, amilases e lipases) são as mais usadas na química orgânica (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Outras classes de enzimas também têm sido testadas em reações industriais para a síntese de produtos químicos altamente complexos com a geração de novos processos ecologicamente corretos (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006).

Quadro 2.1 - Classificação das enzimas conforme tipo de reação

Classificação	Tipo de reação catalisada
Oxidoreductase	Reação de oxidação-redução
Transferases	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	Reações de hidrólise
Liases	Eliminação de grupos para formar ligações duplas
Isomerases	Isomerização
Ligases	Formação de ligação acoplada à hidrólise de ATP

Fonte: Adaptado de Voet et al., 2014.

As forças que unem o substrato à enzima são geralmente ligações não-covalentes similares àquelas que orientam a conformação tridimensional das proteínas, são ligações fracas tais como interações de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (LEHNINGER et al., 2002; VOET et al., 2014).

A função catalítica das enzimas está associada à sua conformação nativa (estrutura tridimensional), que depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio. Condições do meio afastadas das ótimas podem provocar a desnaturação da enzima, ou seja, mudança na sua estrutura tridimensional nativa, muitas vezes irreversível, ocasionando a perda ou alteração de sua atividade catalítica (BON et al., 2008; LEHNINGER et al., 2002).

Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais (por exemplo, pancreatina, tripsina, pepsina e renina) e vegetais (por exemplo, papaína, bromelina, ficina, malte, peroxidase), as enzimas industriais são, na sua maior parte, obtidas a partir de microrganismos, muitos deles modificados geneticamente para aumentar a produtividade da enzima (BON et al., 2008).

Os microrganismos são as principais fontes de enzimas industriais e especiais devido à grande variedade de atividades catalíticas, à possibilidade da produção das enzimas por processos fermentativos em grande escala com a regularidade necessária e à simplicidade dos requerimentos nutricionais (BON et al., 2008). Atualmente muitas enzimas com características diferenciadas para aplicações industriais têm sido isoladas de microrganismos que crescem em condições drásticas de temperatura, pH ou salinidade (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006), as enzimas de microrganismos termófilos podem revolucionar a indústria química nos próximos anos. Dentre as diferentes enzimas de interesse industrial, as lipases têm sido amplamente empregadas em diversos setores da indústria.

2.2 Lipases

Lipases (triglicerolacil-hidrolases, EC 3.1.1.3) em meio aquoso catalisam a hidrólise de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa e em meio orgânico apresentam a capacidade de sintetizar ésteres a partir de alcoóis e ácidos orgânicos (MENDES et al., 2013). As lipases são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. Estas reações geralmente prosseguem com elevada régio e/ou enantiosseletividade, fazendo das lipases um importante

grupo de biocatalisadores em química orgânica. As razões para a enorme potencial biotecnológico de lipases, principalmente as microbianas, incluem o fato de que são relativamente estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de cofatores, possuem uma ampla especificidade de substrato e apresentam uma alta enantiosseletividade (JAEGER; REETZ, 1998).

As lipases são produzidas por animais, plantas e microrganismos. Lipases de origem microbiana representam a classe mais utilizada de enzimas em aplicações biotecnológicas e em química orgânica, devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade frente ao substrato. Muitos microrganismos são conhecidos como potenciais produtores de lipases, incluindo bactérias, leveduras e fungos (TREICHEL et al., 2010).

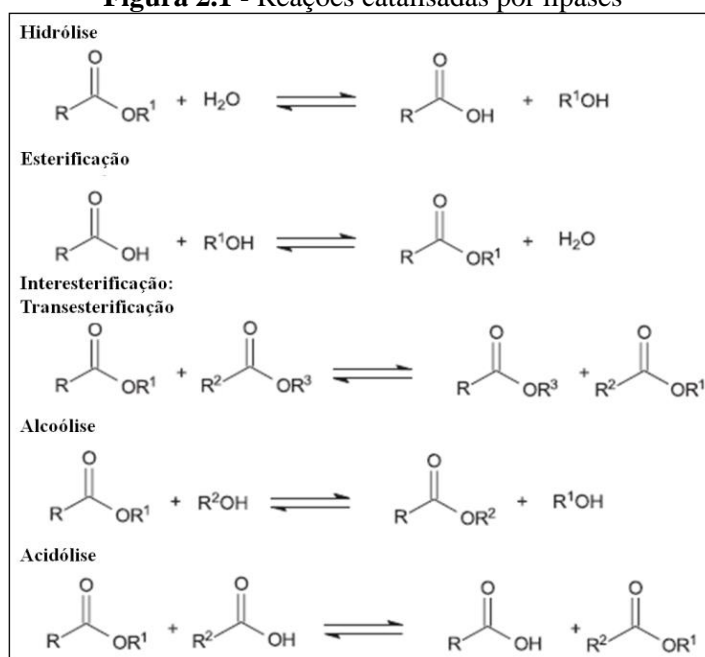
As massas moleculares das lipases conhecidas variam entre 20 kD (existem casos de lipases menores) até cerca de 60 kDa, dependendo da sua origem. O intervalo de temperatura de máxima atividade catalítica observado é geralmente compreendido entre 30 °C e 60 °C. A maioria das lipases utilizadas em biocatálise tem pH ótimo neutro ou alcalino, em alguns casos pH maior que 9,0 (lipases de *Pseudomonas sp* e *Bacillus sp*) lipases ativas em pH próximo a 3,0, ou menor, são incomuns. (POLAINA, J.; MACCABE, A. P., 2007).

Além da reação de hidrólise, as lipases catalisam reações como esterificação, interesterificação (transesterificação, alcoólise e acidólise) (Figura 2.1). A atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (PAQUES; MACEDO, 2006). Os seus substratos naturais são compostos lipídicos insolúveis propensos a agregação em solução aquosa (POLAINA; MACCABE, 2007). As lipases catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol resultando em diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres (CARVALHO et al., 2003). Elas também catalisam a reação reversa em condições de baixa quantidade de água sintetizando ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos. Estes dois processos combinados numa seqüência lógica podem gerar reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (DE CASTRO et al., 2004). Genericamente a reação de acidólise refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido, alcoólise refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um álcool e transesterificação refere-se à troca de radicais entre um éster e outro éster, na forma de glicerídeos ou de monoéster (CARVALHO et al., 2003).

O sítio ativo das lipases é formado por uma tríade catalítica consistindo de aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina (JAEGER; REETZ, 1998). O sítio ativo da enzima é protegido do solvente (água em células vivas) por uma estrutura móvel (oligopeptídeo hidrofóbico), a "tampa" ou "aba" ("lid" em inglês), que deixa o sítio ativo

completamente isolado do meio de reação (nesta conformação a lipase é considerada inativa). Essa tampa precisa ser deslocada como consequência de uma interação com a interface água/óleo, a fim de se obter uma conformação da enzima ativa com o centro catalítico acessível ao substrato (nesta conformação a lipase é considerada ativa) (Figura 2.2). Este fenômeno é referido como “ativação interfacial”. Dessa forma, as lipases preferencialmente atuam em interface água-óleo, ou água-solvente orgânico, e a “ativação interfacial”, está relacionada diretamente com o aumento da atividade da lipase frente a diferentes substratos (POLAINA, J.; MACCABE, A. P., 2007).

Figura 2.1 - Reações catalisadas por lipases



Fonte: Adaptado de Paques e Macedo, 2006.

Figura 2.2 - Diferentes conformações das lipases. Conformação fechada: a Lid fechada expõe sua face externa (hidrofílica) para o meio de reação protegendo com sua face interna (hidrofóbica) o sítio ativo da lipase (hidrofóbico). Conformação aberta: A Lid se desloca na presença de uma interface água/óleo expondo sua face interna (hidrofóbica) e o sítio ativo da lipase (hidrofóbico).



Fonte: Adaptada de Palomo et al., 2004b.

As lipases são empregadas em diversos setores da indústria, tais como detergentes, alimentício, papel, síntese orgânica, fármacos, cosméticos (Quadro 2.2) (SHARMA; CHIST; BANERJEE, 2001).

Quadro 2.2 - Aplicações industriais das lipases

Setor/Indústria	Ação	Produto ou aplicação
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de óleos
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres, emulsificantes
Farmacêutico	Hidrólise; transesterificação	Digestão de óleos
Cosmético	Síntese	Fragrância para perfumes
Limpeza	Hidrólise	Remoção de óleos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Alimentício	Hidrólise de gordura do leite; síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas

Fonte: Adaptado de Sharma et al., 2001; Paques e Macedo, 2006.

O constante crescimento do interesse em lipases ao longo das três últimas décadas decorre de sua versatilidade biotecnológica e da capacidade dessas enzimas em catalisar um amplo espectro de reações com enorme potencial em diversas áreas, tais como na tecnologia de alimentos, ciências biomédicas e da indústria química. Muitas destas aplicações são realizadas com lipases imobilizadas. A imobilização é um método vantajoso que, quando bem conduzido, melhora a estabilidade do biocatalisador e proporciona a separação do catalisador a partir do meio de reação e seu reciclo (MINOVSKA et al., 2005).

2.2.1 Lipase BTL-2

O microrganismo *Bacillus thermocatenuatus* produz duas lipases, BTL1 e BTL-2. A lipase BTL-2 é uma proteína de 43-kDa (prevista a partir da sequência de DNA) que apresenta elevada estabilidade em altas temperaturas (50-60 °C), pH alcalino (9,0-11,0), e em solventes orgânicos (2-propanol, acetona, metanol) (SCHMIDT-DANNERT et al., 1996). Além disso, foi relatado que esta lipase apresenta elevada especificidade frente a diferentes substratos, com uma grande seletividade na resolução quiral de intermediários chaves na síntese de fármacos (PALOMO et al., 2004a). A lipase 2 de *Bacillus thermocatenuatus* (BTL-2) é uma nova candidata para aplicações industriais devido às suas propriedades catalíticas diferenciadas

e alta estabilidade em condições adversas. A BTL-2 é uma lipase termófila e alcalina que tem sido relatada como um biocatalisador enantiosseletivo para diversas reações e que lidera um grupo de enzimas que compartilham alta resistência a muitos agentes de inativação (calor, solventes orgânicos, pH, etc.). Essas propriedades implicam potenciais aplicações industriais o que faz com que BTL-2 seja um alvo importante para investigação (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2008; KARIMI et al., 2014).

Segundo Durmaz et al. (2013), a lipase BTL-2 exibe a sua maior atividade hidrolítica para ésteres de cadeia curta como a tributirina (C4), por exemplo. A tolerância de BTL-2 a altas temperaturas faz ela ser uma lipase adequada para processos industriais por que esses processos são geralmente realizados sob temperaturas menores que a que conduziria à máxima produtividade, para evitar inativação térmica da enzima (DURMAZ et al., 2013). Dessa forma, a BTL-2 pode ser um biocatalisador alternativo, especialmente para a hidrólise de lípidos de cadeia curta como na indústria de laticínios, bem como para a produção do bio-butanol.

Schmidt-Dannert et al. (1994) isolou e caracterizou uma lipase termoestável (BTL-1) do termófilo *Bacillus thermocatenulatus*. A clonagem do gene dessa lipase de baixa massa molecular (16 kDa) produziu uma lipase de maior massa molecular (BTL-2) de 43 kDa (SCHMIDT-DANNERT et al., 1996).

O gene da lipase BTL-2 foi clonado e expresso em *Escherichia coli* por Schmidt-Dannert et al. (1996). A partir do caldo de cultura, as células foram rompidas por sonicação e a purificação foi feita inicialmente por cromatografia de troca iônica empregando colunas de Q e S-sepharose que reteram proteínas contaminantes. Em seguida, foi feita cromatografia por interação hidrofóbica em fenil-sepharose alcançando-se nessa etapa o maior fator de purificação (329 vezes mais pura em relação aos debris celulares). A enzima foi eluída primeiro em água destilada, obtendo-se 11% de atividade lipolítica e posteriormente água destilada contendo 2% (m/v) de octil-glicosídeo, que eluiu 35% da atividade contida na coluna. A BTL-2 purificada apresentou 388 resíduos de aminoácidos; ponto isoelétrico de 7,2; atividade lipolítica máxima na faixa de pH 8,0-9,0 e temperatura de 60 -70°C, com tributirina e palmitato de para-nitrofenila (p-NPP) como substratos, respectivamente. A adição de 0,1% (m/v) de detergentes (octil-glicosídeo, Brij 35, Triton X-100, ácido taurocólico, Tween 20, Lubrol PX) aumentou a atividade da lipase exceto para octil-glicosídeo e Twen 80. A uma concentração de 1% (m/v), Triton X-100, Lubrol PX, e Tween 80 inativaram completamente a lipase. A BTL-2 se mostrou estável por 1h à 30°C, nos solventes etanol, metanol, acetona e 2-propanodiol.

BTL-2 foi clonada em *E. coli* e expressa em maior quantidade aplicando-se um agente promotor de indução por Schmidt-Dannert et al. (1997). A lipase, que estava localizada

no citoplasma das células de *E. coli*, foi purificada por aplicação de cromatografia em Sepharose-butil como o passo chave, seguida por ultrafiltração e filtração em gel. A lipase superexpressada mostrou estabilidade em solventes orgânicos, preferência pela tributirina como substrato e máxima atividade frente a tributirina observada em 60°C e pH 8,0. Schmidt-Dannert et al. (1997) observaram ainda uma tendência da lipase BTL-2 a formar agregados macromoleculares, assim como observado para várias lipases, sendo que na ausência de detergentes ou solventes a lipase tende a se encontrar em uma forma agregada.

Rúa et al., (1998) também expressou a BTL-2 em alto nível utilizando o agente promotor de indução por temperatura λ -PL. Nesse trabalho três vetores de expressão foram construídos. O vetor pT1-OmpABTL2 foi o melhor resultado produzindo 660.000 U de lipase solúvel por grama de células (atividade medida em emulsão tributirina e goma arábica). Carrasco-López et al. (2009) relataram a estrutura cristalina da Lipase BTL-2 em sua conformação aberta. Segundo os autores a ativação enzimática envolveu grandes rearranjos estruturais de cerca de 70 aminoácidos e o movimento de duas lids, as hélices 6- e 7, deixando exposto o seu sítio ativo.

Vélez et al. (2013) estudou a produção de BTL-2 clonada em *E. coli* BL321 sob controle do promotor de indução por temperatura λ -PL. Os autores estudaram a influência da temperatura no crescimento e produção da enzima com experimentos em frascos. Os resultados mostraram que as temperaturas de 30°C e 45°C são as mais adequadas para o crescimento e a indução, respectivamente, e levaram a uma atividade específica da enzima de 706.000 U/g de células secas. As condições de indução mais promissoras identificadas foram validadas em cultivo batelada-alimentada realizado em biorreator de 2 litros que alcançou atividade enzimática específica de 770.000 U/ g de células secas (atividade medida com substrato p-NPP).

Em estudos mais recentes, Karimi et al. (2014) avaliaram o efeito de mutação no resíduo de fenilalanina (Phe-17) nas características da BTL-2 expressa em *Pichia pastoris*. Além da tríade catalítica, a abertura da tampa (aba) e a formação do “hole” oxianion são importantes para a atividade da enzima. Em lipases BTL2, o “hole” oxianion é formado pelos principais hidrogênios da cadeia de amida de fenilalanina 17 (Phe-17) e glutamina 115 (Gln-115) que aponta para dentro da cavidade do sítio ativo. Estes grupos amino estão posicionados de tal forma que um intermédio enzima-substrato tetraédrico é estabilizado. Para facilitar a formação do “hole” oxianion a Phe-17 foi substituída por um resíduo de alanina (F17A) e estudado o efeito da mutação nas características da lipase. A F17A aumentou a estabilidade da lipase e facilitou o acesso da lipase ao substrato.

Algumas estratégias já foram utilizadas para recuperação e purificação da BTL-2 como a cromatografia de troca iônica e por interação hidrofóbica (SCHMIDT-DANNERT et al. 1996) e adsorção em suportes hidrofóbicos como octil agarose (PALOMO et al., 2004a; CARRASCO-LÓPEZ et al., 2008; VOLPATO et al., 2010) e butil-agarose (GODOY et al., 2011). Neste estudo foi empregada a adsorção hidrofóbica em suporte magnético, estratégia de recuperação ainda não reportada na literatura científica para esta enzima.

2.3 Purificação e Recuperação de produtos biotecnológicos

A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, e ao fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais bastante suaves (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Muitos processos industriais que empregam biocatalisadores necessitam que estes estejam presentes em graus de pureza elevados. A implementação do uso de enzimas na indústria pode ser dificultada devido aos problemas na purificação, tais como, separação dos debrís celulares e elevado número de procedimentos necessários para a recuperação e purificação da proteína alvo. A purificação desejada depende geralmente do número de etapas envolvidas no processo e do uso a que se refere o produto final (LIMA, 2001).

O interesse crescente por processos de purificação de biomoléculas deve-se principalmente ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza. A complexidade de um processo de purificação depende da aplicação final da molécula que se pretende purificar, de suas características físico-químicas e também das características das impurezas presentes no meio. (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Em um processo de purificação de proteínas o objetivo é separar a proteína de interesse a partir de um material biológico (celular) ou a partir de um bioprodutos, isolando-a de todo o material não proteico e de todas as outras proteínas. A remoção seletiva das proteínas contaminantes é a parte mais difícil de um processo de purificação, porque, muitas proteínas são semelhantes com relação às propriedades químicas e físicas. Em um caso ideal, onde foi possível remover as proteínas contaminantes, sem qualquer perda da proteína de interesse, claramente a quantidade total de proteína irá diminuir, enquanto a atividade biológica (o qual define a concentração específica da proteína de interesse) irá permanecer inalterada (DENNISON, 2003).

A recuperação e purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou células de animais é um processo complexo, devido à baixa concentração da biomolécula no meio, que exige sempre concentração, e às variadas características dos cultivos empregados, da biomolécula de interesse e dos contaminantes presentes. (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005)

Para viabilizar a aplicação de enzimas em aplicações industriais são necessárias técnicas eficientes para o isolamento a partir de uma cultura de produção microbiana ou extratos vegetais/animais para satisfazer o grau de pureza desejado para o produto final. Processos tradicionais de purificação de proteínas compreendem tipicamente várias etapas com diferentes técnicas de concentração e purificação. Aumentar o número de operações de separação para melhorar o grau de pureza traz a redução da atividade da enzima em cada passo, pois será necessariamente acompanhado de alguma perda em cada passo, com aumento do custo do processo e conseqüentemente do produto final. A recuperação torna-se cada vez mais importante conforme o valor do produto purificado aumenta. Desta forma, existe necessidade de se obter alternativas eficientes para a purificação de enzimas com seletividade suficiente, recuperação máxima, alta preservação da atividade enzimática além de baixo custo. (LINKE; BERGER, 2011; LIMA, 2001).

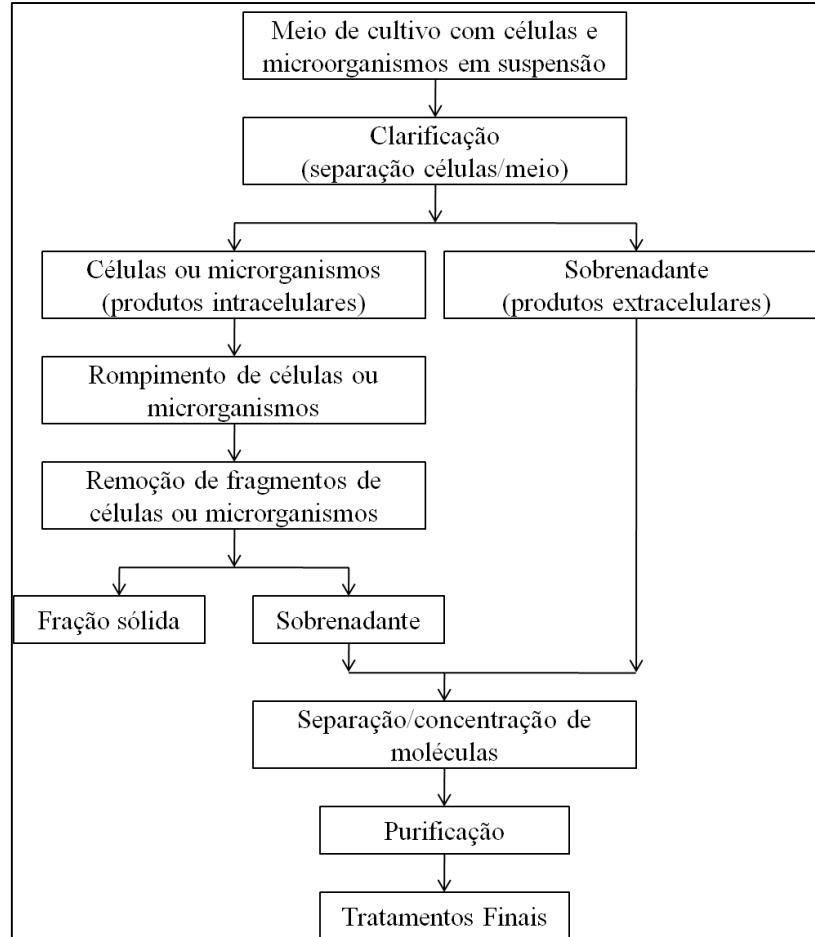
A complexidade do processo de purificação depende da aplicação final da molécula que se pretende purificar e do grau de pureza necessário para essa aplicação, de suas características físico-químicas e também das características e concentração de impurezas. Para produtos como compostos orgânicos e algumas enzimas industriais cuja aplicação não requer alta pureza podem ser usados procedimentos mais simples de purificação com número reduzido de etapas. Produtos farmacêuticos, geralmente, são os que requerem maior grau de pureza, portanto um processo de purificação mais complexo deverá ser utilizado, sendo que seu custo pode chegar a 80% do custo final do produto (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

A escolha de um processo de purificação depende também da molécula alvo e da fonte de obtenção desta molécula. As características da molécula devem ser levadas em consideração, visando à manutenção de sua estrutura molecular e sua estabilidade nas diversas condições operacionais e procedimentos utilizados para sua purificação (ARRUDA, 1999).

Devido à grande diversidade de produtos biotecnológicos e suas diferentes características não há processos de purificação de aplicação geral. No entanto, a purificação pode ser dividida em quatro etapas genéricas: separação de células e seus fragmentos do meio de cultura (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução; purificação de alta

resolução e operações para armazenamento final do produto (polimento) (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). A Figura 2.3 apresenta um fluxograma genérico do processo de purificação.

Figura 2.3 - Etapas de um processo genérico de purificação de biomoléculas



Fonte: Adaptado de Pessoa Júnior; Kilikian, 2005.

A clarificação remove os sólidos suspensos resultando na redução da turbidez do meio. Para produtos intracelulares é necessário efetuar o rompimento celular sob o aglomerado de células obtidas após a clarificação do meio de cultivo. Os produtos intracelulares liberados em solução tornam o processo de purificação mais difícil quando comparado a processos onde a molécula alvo é secretada para o meio. O rompimento celular ocasiona o aumento da viscosidade do meio, resultante da liberação de nucleotídeos, e a molécula alvo é liberada juntamente com todas as outras moléculas intracelulares, o que amplia a diversidade dos contaminantes (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

O Quadro 2.3 apresenta as operações unitárias empregadas nos processos de purificação viáveis em escala industrial, a etapa à qual pertencem e o princípio de separação da biomolécula alvo (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Quadro 2.3 - Operações Unitárias do processo de purificação de produtos biotecnológicos

Etapa do processo	Operações unitárias	Princípios
Clarificação	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
	Filtração tangencial (membranas)	Tamanho de partículas
	Floculação	Hidrofobicidade de partículas
Rompimento de células	Homogeneização	Cisalhamento
	Ultra-som	Cisalhamento
	Moagem de moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise, solubilização ou desidratação de moléculas que compõem a parede ou a membrana celular
Purificação de baixa resolução	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico de moléculas
	Extração em sistemas de duas fases líquidas	Solubilidade, massa molar
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca -iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade (biológica ou química)	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção)
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção, antígeno/anticorpo)
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão molecular	Massa molar
	Membranas adsortivas	Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína
Tratamentos finais	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido
	Liofilização	Características de equilíbrio líquido-sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido-sólido

Fonte: Adaptado de Pessoa Júnior; Kilikian, 2005.

As operações de concentração e/ou purificação de baixa resolução compreendem a separação da molécula alvo, por exemplo, uma proteína, em relação às moléculas com características físico-químicas significativamente diferentes, como água, íons, aminoácidos, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos. Em processos de purificação de média resolução, a molécula alvo pode ser também ser separada de algumas proteínas com características físico-

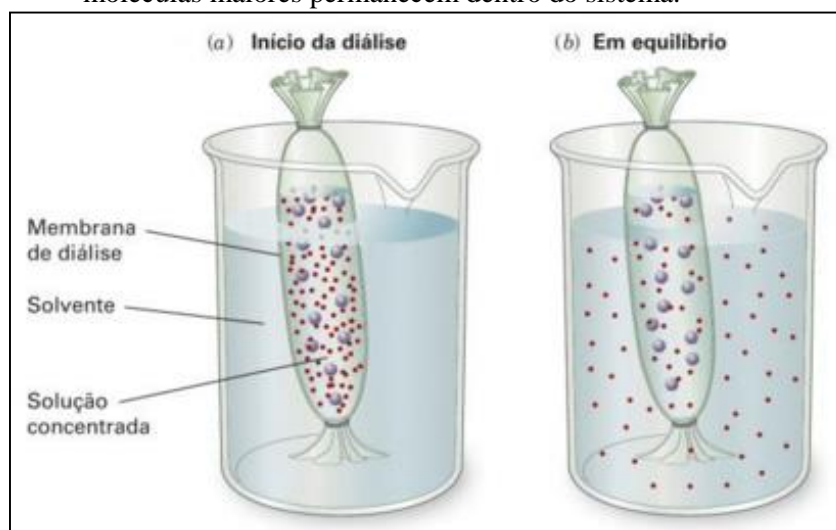
químicas distintas. A purificação de alta resolução compreende a separação de classes de moléculas com características físico-químicas semelhantes, no caso, portanto, separação da proteína alvo de outras proteínas similares.

2.4 Diálise

A diálise é uma técnica bastante empregada como uma etapa para a purificação de proteínas. Nessa técnica as moléculas em solução são separadas por massa molecular empregando uma membrana semipermeável (PINNOTI, 2003).

O gradiente de concentração do soluto em relação à solução externa à membrana promove a difusão das moléculas menores que o tamanho do poro, das regiões mais concentradas para as menos concentradas, até que o equilíbrio seja alcançado. Conforme ilustrado na Figura 2.4, a solução concentrada contendo a proteína é colocada no interior da membrana de diálise e o sistema é incubado em solvente (tampão ou água ultrapurificada). O solvente pode ser substituído várias vezes aumentando a eficiência da técnica (PINNOTI, 2003; VOET et al., 2014).

Figura 2.4 - Esquema de processo de diálise. (a) Uma solução concentrada é separada por uma membrana de diálise de um grande volume de solvente. (b) Apenas as moléculas menores, em vermelho, se difundem através dos poros membrana até que o sistema atinja o equilíbrio e as moléculas maiores permanecem dentro do sistema.



Fonte: Adaptado de Voet et al., 2014

Essa técnica é bastante interessante para remoção de íons, carboidratos, oligopeptídeos e pequenas proteínas contaminantes.

2.5 Adsorção

Adsorção é definida como a fixação de proteínas na superfície de partículas de um suporte insolúvel por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples, sendo de fácil preparação e de baixo custo. Além disso, ele permite a reutilização do suporte (adsorvente). No entanto, uma desvantagem da adsorção física é a fácil dessorção da proteína por mudanças no pH, temperatura, força iônica, concentração de substrato ou tampões utilizados nas medições da atividade (DALLA VECHIA, 2004; GUIBAN, 2006; SECUNDO et al., 2008), esse fato pode ser um problema quando a proteína adsorvida for uma enzima que está sendo empregada em um processo industrial.

A eficiência da adsorção da proteína depende das características do suporte/adsorvente, que serão mais bem exploradas no item 2.6 e também da concentração da molécula alvo. A quantidade de proteína adsorvida por quantidade do suporte geralmente aumenta com a concentração de proteína no meio de reação (DALLA VECHIA, 2004).

2.5.1 Adsorção por troca iônica

A adsorção iônica das proteínas ocorre pela diferença de potencial eletrostático entre as cargas distribuídas na superfície da proteína e os grupos iônicos do suporte (SCOPES, 1998). Nessa técnica pode-se explorar o pKa da proteína alvo para alcançar uma adsorção seletiva. As proteínas, em geral, ficam carregadas positivamente em valores de pH abaixo do seu pKa porque os resíduos dos aminoácidos estão protonados. Em valores de pH acima de seu pKa apresentam em geral uma carga superficial líquida negativa. Dessa forma, a seleção dos tampões adequados a serem empregados nas etapas de adsorção e eluição é um fator crítico para o sucesso da separação de biomoléculas empregando troca-iônica (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005).

2.5.2 Adsorção por interação hidrofóbica

A separação de proteínas por interação hidrofóbica baseia-se na ligação reversível entre as regiões hidrofóbicas da proteína e os ligantes hidrofóbicos da superfície do suporte. Os suportes empregados geralmente possuem grupos fenil, butil ou octil em sua

superfície (HARRISON et al., 2015). A interação hidrofóbica é significativamente influenciada pela presença de sais no meio. De maneira geral, uma concentração elevada de sais favorece a interação hidrofóbica enquanto a diminuição da concentração de sais enfraquece a interação (HEALTHCARE, 2007b). No entanto, a adsorção hidrofóbica é uma técnica que pode alcançar alta seletividade na purificação de moléculas hidrofóbicas a baixa força iônica. O uso de suportes hidrofóbicos em soluções com baixas forças iônicas (5-10 mM) favorece a adsorção seletiva, uma vez que somente moléculas altamente hidrofóbicas irão se adsorver à superfície do suporte. O aumento da força iônica do meio reacional favorece a adsorção das demais moléculas presentes no extrato enzimático (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; MCCUE, 2009). A dessorção das moléculas unidas por interações hidrofóbicas pode ser realizada pela redução da força iônica do meio, uso de detergentes ou pelo aumento do pH do meio reacional (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). A lipase BTL-2 tem sido purificada por adsorção em suportes hidrofóbicos, tais como: agarose-octil (PALOMO et al., 2004a; CARRASCO-LÓPEZ et al., 2008; VOLPATO et al., 2010) e butil-agarose (GODOY et al., 2011). Neste estudo foi empregada a adsorção hidrofóbica em suporte magnético, estratégia de recuperação ainda não reportada na literatura científica para esta enzima.

2.6 Suportes para adsorção

As características do suporte são de grande importância para determinar a eficiência da adsorção de uma enzima. A escolha de um suporte e de um protocolo de imobilização adequados pode aumentar várias vezes a estabilidade de uma enzima em condições de processo e até mesmo aumentar sua atividade catalítica em determinada condição (GUISÁN, 2006).

As propriedades de um bom suporte para adsorção incluem resistência física à compressão, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima, facilidade de derivatização, biocompatibilidade, resistência ao ataque microbiano, disponibilidade e baixo custo (DALLA-VECHIA et al., 2004; GUISÁN, 2006).

Suportes para adsorção ou imobilização de proteínas podem ser classificados como inorgânicos e orgânicos de acordo com a sua composição química, os suportes orgânicos podem ser subdivididos em naturais e sintéticos conforme o Quadro 2.4 (GUISÁN, 2006).

Quadro 2.4 - Classificação dos suportes

Orgânico
Polímeros naturais
<ul style="list-style-type: none"> • Polissacarídeos: celulose, dextranas, agar, agarose, quitina, alginato • Proteínas: colágenos, albumina • Carbono
Polímeros sintéticos
<ul style="list-style-type: none"> • Poliestireno • Outros polímeros: polimetacrilatos, poliacrilatos, poliamidas, poliacrilamida, vinil e alil-polímeros
Inorgânico
Minerais naturais: bentonite, sílica natural;
Materiais processados: Materiais sintéticos a base de silício (sem poros e poros controlados, metais, óxidos metálicos porosos controlados, óxidos metálicos não porosos e partículas magnéticas)

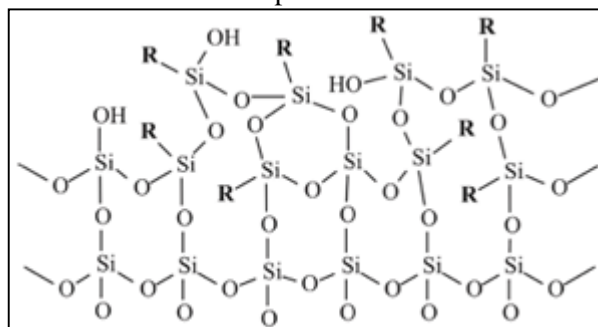
Fonte: Adaptado de Guisán, 2006.

Características como área superficial do adsorvente, porosidade e tamanho dos poros podem afetar a capacidade de ligação de proteínas a superfície do material. Suportes não porosos apresentam pouca limitação difusional, mas possuem baixa capacidade de carga e não produzem nenhum efeito de microambiente. O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros (DALLA-VECHIA et al., 2004). A alta área superficial dos suportes porosos permite um maior carregamento da enzima e esta fica mais protegida do ambiente quando adsorvida no interior dos poros. Os suportes inorgânicos apresentem vantagens como maior resistência à degradação física, química e microbiana (GUISÁN, 2006).

Um suporte que tem sido amplamente usado para a purificação de proteínas e imobilização de enzimas é a agarose (GUISÁN, 2006). A agarose é uma fração de um polímero natural conhecido como ágar. Este polímero natural é obtido a partir de algas vermelhas e sua cadeia principal é constituída por agarobiose, molécula formada por 1,3- β -D-galactopiranosose e 1,4- α -galactopiranosose ou seu derivado anidro 1,3- β -D-galactopiranosose 3,6-anidro-galactose. A agarose possui características vantajosas como elevada porosidade, alta área superficial e fácil derivatização a partir de grupos hidroxila. No entanto, assim como outros suportes porosos, possui elevado custo comercial (FERREIRA, 2004; GUISÁN, 2006).

Outro exemplo de suporte poroso, porém inorgânico, é a sílica porosa. A sílica é um produto sintético, produzido pela reação de silicato de sódio e ácido sulfúrico. Ao serem misturados, forma-se um hidrosol que lentamente se contrai para formar uma estrutura sólida de sílica gel, também chamada hidrogel (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). A Figura 2.5 apresenta a estrutura morfológica da sílica.

Figura 2.5 - Estrutura morfológica da sílica com uma camada de organossilano (R = octil) na superfície.



Fonte: Adaptado de Maldaner, 2010.

A sílica macroporosa apresenta uma série de vantagens, tais como: elevada resistência mecânica à compressão, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e degradação microbiana. Entretanto, normalmente apresentam baixa resistência à abrasão e cisalhamento (CANILHA et al., 2013; FERREIRA, 2004). Sílica porosa e agarose ao lado de materiais a base de poliestireno, são os materiais mais empregados industrialmente para purificação de proteínas e imobilização de enzimas.

2.7 Suportes Magnéticos

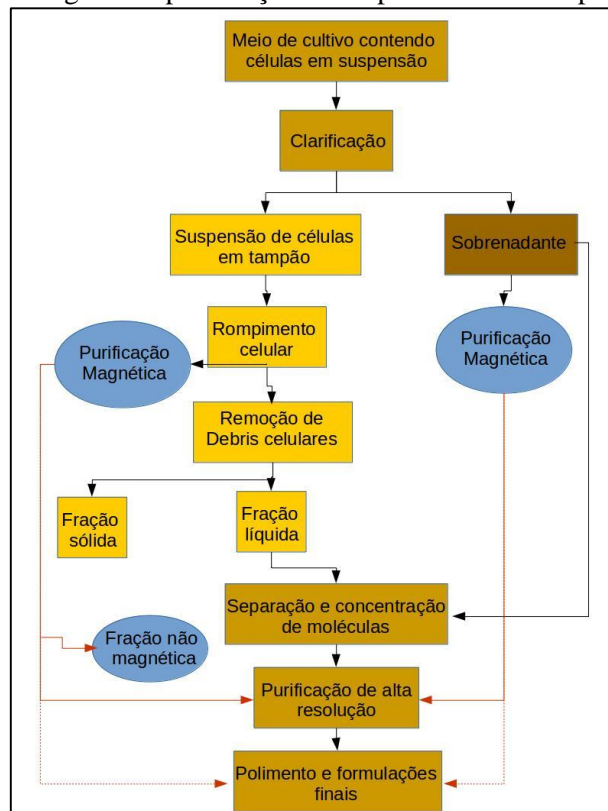
Suportes magnéticos têm ganhado atenção devido às suas propriedades especiais, que apresentam aplicações promissoras no isolamento e separação de proteínas, enzimas e outros agentes bioativos em bioquímica, medicina e biotecnologia. A separação magnética é relativamente rápida, fácil, de baixo custo e de alta eficiência (WANG *et al.*, 2009).

A aplicação de partículas adsorventes magnéticos funcionalizadas em combinação com técnicas de separação magnética tem recebido considerável atenção nos últimos anos (KOPP, 2013). A natureza magneticamente sensível de tais partículas adsorventes permite a sua manipulação seletiva e separação na presença de outras partículas sólidas em suspensão. Assim, torna-se possível separar magneticamente moléculas-alvo selecionadas diretamente de caldos de fermentação, plasma, leite, soro de leite e extratos de plantas, por exemplo, simplesmente ligando-os em adsorventes magnéticos antes da aplicação de um campo magnético externo. Ao utilizar a separação magnética, as diversas fases de pré-tratamento da amostra (especialmente centrifugação, filtração e separação por membrana), que normalmente são necessários podem ser eliminadas. (FRANZREB *et al.*, 2006).

A Figura 2.6 exemplifica o grande potencial de uso de materiais magnéticos na purificação de bioprodutos em nível de bancada e industrial. Se o produto for secretado pelo

microrganismo (extracelular) é possível eliminar operações unitárias como a clarificação e a separação/concentração da molécula alvo. Se o produto for intracelular é possível eliminar etapas como remoção de debris celulares e separação/concentração da molécula alvo. Como a adsorção de substâncias em materiais magnéticos é um processo de equilíbrio simples, geralmente não é possível alcançar grande resolução na separação de uma molécula alvo, por isso se o grau de pureza exigido para o produto final é elevado purificações complementares usando técnicas de alta resolução, como a cromatografia, podem ser necessárias. No entanto, através do conhecimento das características físico, químicas e estruturais da molécula alvo e das características de química de superfície do adsorvente (tipo e densidade superficial do ligante) é possível tornar a interação adsorvente-molécula alvo mais seletiva possibilitando boa resolução na purificação. Dessa forma, a adsorção seletiva pode facilitar e baratear procedimentos de purificação de alta resolução e até mesmo resultar em um produto de pureza adequada para a aplicação pretendida.

Figura 2.6 - Esquema geral de purificação de bioprodutos usando partículas magnéticas



Fonte: Arquivo próprio.

Em alguns casos, como a purificação de anticorpos usando proteína A ou G (AYYAR et al., 2012; CHON, ZARBIS-PAPASTOITSIS, 2011; HEALTHCARE, 2007a) e purificação de proteínas com calda de poli-histidina (RUO-BING et al., 2007; BARBOSA et

al., 2015); usando materiais modificados com quelatos metálicos (geralmente cobre, níquel e cobalto) é possível atingir altos níveis de pureza excluindo a necessidade de procedimentos cromatográficos. Também é possível obter alta resolução em processos de purificação de bioprodutos empregando materiais magnéticos modificados com anticorpos monoclonais específicos para a molécula alvo, essa abordagem é utilizada no desenvolvimento de testes bioquímicos.

Nanopartículas magnéticas são atraentes devido à alta área superficial, o que permite o carregamento de uma maior quantidade de proteína. Quando a proteína é uma enzima, o fato dela estar ligada externamente à uma partícula de tamanho similar a ela implica uma menor resistência à transferência de massa na difusão de substratos. Além disso, nanopartículas magnéticas possuem baixa toxicidade, biocompatibilidade e facilidade de separação a partir de uma mistura de reação pela aplicação de um campo magnético, com conseqüente boa capacidade de reutilização, contando também com uma superfície quimicamente modificável. (WANG et al., 2012; ZU et al., 2014). Apesar das vantagens em utilizar nanopartículas magnéticas, em muitos casos a separação magnética é ineficiente e demorada, principalmente em processos realizados em escalas maiores. A solução para resolver esse problema é empregar micropartículas magnéticas altamente porosas contendo nanopartículas com propriedades superparamagnéticas em seu interior. Através desta abordagem é possível adsorver grande quantidade da molécula alvo e garantir uma separação magnética rápida e eficiente, independentemente da escala do processo (KOPP, 2013).

As nanopartículas magnéticas possuem uma propriedade interessante de superparamagnetismo que os materiais magnéticos em escala macrométrica não possuem. Com esta propriedade as nanopartículas são atraídas por um campo magnético externo e quando este campo magnético é removido elas não apresentam magnetismo remanescente. Desta forma as nanopartículas magnéticas podem ser usadas em soluções e ao serem removidas não apresentaram problemas como aglomeração (KOPP, 2013).

Segundo ZU et al. (2014) várias enzimas foram imobilizadas em superfícies de nanopartículas magnéticas através de uma variedade de grupos funcionais incluindo amina, aldeído, carboxílico, epóxi, mercapto, extremidades de maleimida. A atividade enzimática e estabilidade foram significativamente melhoradas. Partículas magnéticas revestidas com sílica e funcionalizadas com grupo amino e epóxi foram utilizados para imobilizar covalentemente lipases.

O óxido de ferro magnetita ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ ou Fe_3O_4) é o material comumente empregado como núcleo magnético na preparação de suportes magnéticos para aplicações em

bioprocessos e pode ser sintetizada a partir de soluções aquosas de sais de ferro di e tri-valentes (KOPP, 2013). O recobrimento de nanopartículas magnéticas se faz necessário para garantir a estabilidade do material e evitar a formação de agregados uma vez que as nanopartículas magnéticas possuem alta relação área de superfície/volume e apresentam alta energia de superfície favorecendo sua agregação quando em solução, além de sua alta reatividade química (KOPP, 2013; WU, HE e JIANG, 2008).

Os grupos Fe-OH da superfície de hematita e magnetita podem ser usados como sítios de modificação ou de adsorção. Dentre os métodos de recobrimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro o mais amplamente utilizado é a cobertura com silanos, que possibilita a inserção de grupos orgânicos funcionais (geralmente grupos amino e epóxido) na superfície das partículas. Os derivados de silano possuem algumas vantagens, incluindo: melhor estabilidade estrutural através da superfície química encoberta por silanização; possibilidade de fixação de vários grupos funcionais, tais como $-NH_2$, $-SH$, $-COOH$ para posterior funcionalização, proteção das partículas magnéticas de oxidação através do revestimento de sílica quimicamente inerte sem afetar as suas propriedades magnéticas (KOPP, 2013; WANG et al., 2012).

São reportados na literatura trabalhos de imobilização e purificação de algumas lipases usando suportes magnéticos como: imobilização de lipase de *Candida rugosa* em nanopartículas magnéticas modificadas com silano alquil (WANG et al., 2009); imobilização covalente da lipase pancreática porcina em nanopartículas magnéticas ativadas com carboxilo (Zhu et al., 2014); imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em nanopartículas magnéticas revestidas com polietilenoimina (MOTEEVALIZADEH et al., 2015).

Hernández-García et al. (2014) purificaram e imobilizaram um extrato comercial de lipase A de *Aspergillus niger* utilizando partículas magnéticas ativadas com grupos octil. A lipase foi purificada através de adsorção em pH 7,0 a baixa força iônica (5 mM) utilizando partículas magnéticas comerciais MaKProt C8 e desorvida do suporte com solução de Triton X-100 0,2%, o extrato desorvido do suporte foi purificado em um fator de 66,75 vezes em relação ao extrato comercial inicial.

2.8 Imobilização de Lipases

O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas tem sido importante para viabilizar o seu uso em processos industriais. A imobilização da enzima permite a sua

reutilização, facilita a separação dos produtos e quando bem realizada aumenta estabilidade do biocatalisador em condições de processo (DALLA-VECHIA et al., 2004).

Diferentes protocolos têm sido empregados na imobilização e estabilização de lipases como adsorção hidrofóbica, adsorção iônica, encapsulação em matrizes orgânicas, inorgânicas e matrizes híbridas além de ligação covalente unipontual e multipontual em suportes previamente ativadas (MENDES et al., 2013).

Como exemplos específicos de métodos e suportes usados na literatura tem-se a ligação covalente multipontual em glioxil-agarose (RODRIGUES et al., 2008; BOLIVAR et al., 2009), em glutaraldeído-agarose (RODRIGUES et al., 2008; MENDES, 2009), em glioxil-quitosana alginato (MENDES et al., 2011a), em glutaraldeído-quitosana (SILVA et al., 2012a); encapsulação via sol-gel (JAEGER, REETZ, 1998); e adsorção em suportes como butil- e octil-agarose e butil- e hexil- toyopearl (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008), octadecil-sepabeads (PALOMO et al., 2002), adsorção em nanotubos de carbono (PRLAINOVIC et al., 2013) e em microparticulas magnéticas de sílica porosa (SMMps) (KOPP et al., 2015), dentre outros.

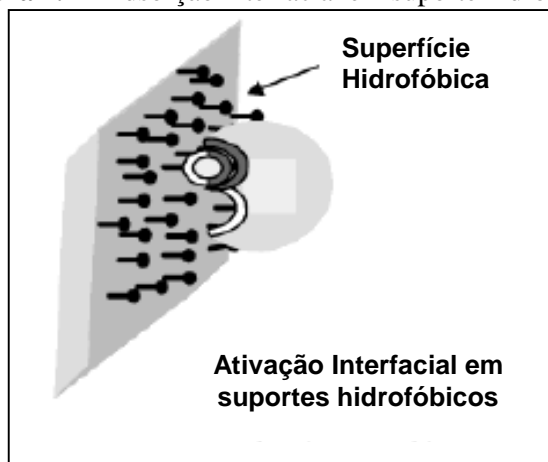
O método mais popular de imobilização de lipases é a adsorção em suportes hidrofóbicos (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998). A escolha desse método pode ser justificada devido à grande região hidrofóbica da lipase ao redor do seu sítio ativo, à facilidade e simplicidade do método, por ser de baixo custo e permitir a reutilização do suporte (SECUNDO et al., 2008). No caso de lipases, a imobilização em suportes hidrofóbicos em condições específicas além de aumentar a sua estabilidade pode aumentar a sua atividade enzimática (hiperativação) (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

Para superar os problemas derivados de purificação de enzimas (tempo, alto custo, inativação da enzima, etc) e tendo em conta o fato de que muitos processos exigem que a enzima seja imobilizada para viabilizar sua aplicação, uma solução adequada seria ligar os passos de purificação e imobilização em somente uma etapa (PESSOLA, 2003).

A imobilização de lipases por ativação interfacial em suportes hidrofóbicos em baixa força iônica tem sido relatada como sendo um método muito simples e eficiente para purificar e imobilizar lipases. Nesse método, a lipase é adsorvida na sua forma aberta por interações entre o ambiente hidrofóbico de seu sítio ativo - a face interna da tampa e a área em torno do sítio ativo da lipase - e a superfície hidrofóbica do suporte (Figura 2.7). A utilização deste mecanismo tem sido proposta como uma forma simples de se obter a lipase purificada, na conformação aberta, estabilizada e imobilizada em suportes hidrofóbicos. A adsorção da lipase no suporte é bastante forte, mas é ainda reversível, permitindo a recuperação e reutilização do

suporte após inativação da enzima. (PALOMO et al., 2004a; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008).

Figura 2.7 - Adsorção interfacial em suporte hidrofóbico



Fonte: Adaptada de Palomo et al., 2004a.

Segundo Barbosa et al. (2015), uma alta força iônica no processo de imobilização/purificação de lipases pode ter dois efeitos negativos: outras proteínas podem adsorver no suporte hidrofóbico reduzindo o efeito de purificação e a adsorção da lipase é mais lenta, pois a conformação fechada da lipase é favorecida e a adsorção será uma adsorção hidrofóbica convencional que não é tão eficiente como a adsorção por ativação interfacial.

Palomo et al. (2004a) purificaram a lipase de BTL-2 clonada em *E. coli* por adsorção interfacial em suportes hidrofóbicos seguida pela dessorção com Triton X-100. A lipase foi adsorvida em agarose-octil a baixa força iônica e a dessorção feita com Triton X-100. A presença de Triton previne a formação de dímeros de lipases alterando a atividade catalítica. Para obter a enzima pura livre de detergente a mistura lipase/detergente foi adsorvida em DEAE-agarose e lavada com água para retirar o detergente. Posteriormente, a enzima foi dessorvida do suporte com tampão fosfato 200 mM, dialisada e concentrada com filtro Centricon. O gel de SDS-PAGE identificou apenas uma banda de proteína após a concentração sendo esta equivalente a massa molecular da lipase BTL-2. Nesse mesmo trabalho, a enzima foi imobilizada em quatro suportes diferentes utilizando diferentes estratégias de imobilização: suporte octadecil-sepabeads por ativação interfacial; glioxil-agarose por ligação multipontual covalente, suporte PEI ou DEAE por adsorção iônica. A lipase imobilizada em octadecil-sepabeads mostrou-se o melhor suporte para imobilização promovendo hiperativação na atividade enzimática. Além disso, resultou na preparação imobilizada mais estável, mantendo 100% da atividade inicial a temperaturas elevadas (65 °C) e na presença de 30% dioxano, ainda melhor do que a imobilização covalente de suporte glioxil-agarose, onde a lipase manteve 80%

atividade e 90%, respectivamente. Segundo Palomo et al. (2004a), este resultado confirma que a estabilização da forma aberta da lipase pode produzir preparações imobilizadas mais estáveis do que a ligação covalente multipontual da enzima.

Fernandez-Lorente et al. (2008) imobilizaram diferentes lipases, incluindo a BTL-2, em quatro suportes hidrofóbicos diferentes por ativação interfacial (hexil- e butil-toyoppearl e butil- e agarose-octil). A BTL-2 aumentou sua atividade em pNPB em um fator de duas vezes quando imobilizada em butil e agarose-octil e hexil-toyoppearl e por um fator 1,5 vezes quando o suporte de imobilização foi o butil-toyoppearl. BTL-2 imobilizada nos diferentes suportes foi incubada a concentrações crescentes de detergente Triton X-100 para se medir a quantidade necessária de detergente para dessorver 100% da enzima. Maior a concentração de detergente necessária para dessorção da enzima, maior a força com que esta estava adsorvida ao suporte. A lipase dessorveu mais facilmente dos suportes agarose sendo 0,2% de Triton X-100 para octil e 0,3 % para butil e 0,4% para hexil-toyoppearl 0,6% para butil-toyoppearl.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Enzimas

Lipase BTL2 de *Bacillus thermocatenuatus* (Rúa, et al., 1997), expressada em *E.coli* recombinante, foi previamente produzida no **Laboratório de Engenharia de Processos Enzimáticos-LabEnz** do DEQ-UFSCar, segundo metodologia desenvolvida por Vélez (2013). O gene da lipase BTL2, doado pelo Prof. J.M. Guisan, ICP-Madri, foi clonado e expresso em *Escherichia coli* usando o plasmídeo pCYTEXP1 sob o controle do promotor λ PL que induz a produção da enzima através de choque térmico e o cultivo foi realizado em biorreator de 2L à temperatura de 30°C e 45°C. As células de *E.coli* contendo a enzima expressada foi então centrifugada e estocada em ultrafreezer a -80°C. O derivado imobilizado Lipozyme IM TL foi gentilmente doado pela empresa Novozymes.

3.1.2 Suportes

Micropartículas Magnéticas de Sílica (SMMps), com superfície modificada pela adição de diferentes grupos foram produzidas *in house*, conforme descrito adiante, nos itens 3.3.6 e 3.3.7 deste capítulo. A sílica Immobead IB-S60S (sílica extra macro porosa de tamanho 60-200 μ m) adquirida da Chiral Vision (Leiden, Holanda). Octil-Sepharose[®] CL-4B (agarose-octil) foi adquirida da GE Healthcare (Uppsala, Suécia) (tamanho médio da partícula 90 μ m).

3.1.3 Reagentes, sais, solventes, consumíveis diversos

Cloreto de ferro (II) tetrahidratado, cloreto de ferro (III) hexahidratado, ácido butírico, 1-butanol, trietoxi(octil)silano, (3-aminopropil)trietoxisilano, kit de determinação de proteína por ácido bicinconínico, reagente de Bradford, padrão de proteína BSA, rosa de bengala, heptano e membranas de celulose (10 kDa) e tributirina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Gel de acrilamida/bis-acrilamida 12%, tampão de corrida (10x) foram adquiridos da GE Healthcare (Uppsala, Suécia). Peneira molecular adquirida da J.T. Baker (New Jersey, EUA). Tolueno adquirido da Panreac (Barcelona, Espanha). Cloreto de

sódio e ácido acético adquirido da Qhemis (Brasil). Biftalato de potássio da Quimibrás (Rio de Janeiro, RJ). Silicato de sódio, álcool terciário e o Triton X-100 foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ). Acetona, ácido cítrico, citrato de sódio, ciclohexano, álcool etílico absoluto (95,5%), fenolftaleína, fosfato de sódio bibásico dodecahidratado, fosfato de sódio monobásico anidro, dodecilsulfato de sódio e o hidróxido de potássio da Synth (São Paulo, Brasil). Os demais reagentes usados eram de grau analítico de diferentes marcas.

3.2 Métodos Analíticos

3.2.1 Hidrólise da Tributirina

A atividade enzimática de BTL-2 livre e adsorvida em diferentes suportes foi determinada pelo método de hidrólise da tributirina, conforme metodologia adaptada de Beisson et al. (2000). O método baseia-se na velocidade inicial de hidrólise de tributirina (1 mL de tributirina, 5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5 e 14 mL de água destilada), a 37°C. O ácido butírico liberado em 5 minutos era titulado com solução de KOH 0,020M padronizada, com o pH mantido em 7,5 pelo pHstato. Foi utilizado o equipamento pHstato modelo 907 Titrande (Metrohm AG, Switzerland). A concentração de enzima utilizada no ensaio foi controlada para garantir que a formação de ácido não passasse de 10% da máxima possível, garantindo-se que velocidade inicial fosse medida. Uma unidade de atividade (TBU) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácido butírico por minuto sob as condições reacionais (Equação 1):

$$\text{Atividade (U}_{\text{TBU}}/\text{mL}) = \frac{\text{mL de titulante por minuto} * \text{concentração molar do titulante} * 1000}{\text{mL da amostra}} \quad (1)$$

3.2.2 Atividade de Esterificação

A determinação da atividade de esterificação da lipase livre e imobilizada foi realizada segundo Abbas e Comeau (2003), com algumas modificações. A síntese do butirato de butila foi realizada em frascos fechados contendo solução de ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano. Adicionaram-se 250 mg de peneira molecular para absorver água em excesso do meio. Uma determinada quantidade de enzima (livre ou

imobilizada) foi adicionada a 10 mL do meio reacional e incubada a 37°C e 300 rpm por diferentes períodos. Uma alíquota de 1 mL foi retirada ao final da reação (geralmente realizada até o tempo final de 5 minutos) e adicionados a 10 mL de solução etanol/acetona (1:1) para a quantificação de ácido butírico residual e, conseqüentemente, a determinação da concentração de butirato de butila formado. O consumo de ácido butírico foi analisado por titulação com KOH 0,01M padronizado empregando um pHstato modelo 907 Titrande (Metrohm AG, Switzerland). Calculou-se a atividade de esterificação baseada na velocidade inicial de síntese do butirato de butila conforme a Equação 2. Uma unidade de atividade de esterificação (U_{Est}) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 μ mol de butirato de butila por minuto nas condições reacionais.

$$\text{Atividade } (U_{Est}/\text{mL}) = \frac{(V_b - V_a) * \text{concentração molar do titulante} * 1000}{\text{volume da amostra} * \text{tempo}} \quad (2)$$

Onde V_a é o volume de titulante gasto na titulação da amostra e V_b é o volume gasto na titulação do branco (sem conter amostra).

3.2.3 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976) para os experimentos de adsorção. Amostras de 25 μ L foram adicionadas a 1mL da solução reagente comercial da Sigma-Aldrich para a determinação da concentração de proteínas totais. Após 5 minutos, foi feita a leitura da absorbância a 595 nm. As leituras foram comparadas com uma curva padronizada que forneceu a concentração de proteínas totais em gramas por litro (g/l) preparada utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Em casos onde a enzima encontra-se na presença de Triton X-100 ou outros surfactantes, foi utilizado o método do ácido bicinonínico (BCA) segundo Smith (1985). Utilizou-se kit de medida de proteína comercial da Sigma-Aldrich contendo uma solução de ácido bicinonínico (reagente A) e uma solução 4% (m/v) de sulfato de cobre (II) pentahidratado (reagente B). O reagente A foi misturado ao reagente B na proporção 50:1. Então, 0,1 mL de amostra foi adicionado a 2 mL da mistura e incubado a 37°C por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro, a 562 nm, e uma curva de concentrações de albumina de soro bovino (BSA) era utilizada como padrão.

3.3 Procedimentos Experimentais

3.3.1 Obtenção da Enzima

Uma determinada quantidade da biomassa previamente produzida, estocada em ultrafreezer, foi ressuspensa em tampão fosfato pH 8,0 (100 mM) na concentração de 20 g/l. As células em suspensão foram submetidas à sonicação com 10 pulsos de 1 minuto (8-10 watts) e amplitude de 20 mHz com intervalo de 30 segundos entre cada pulso utilizando o sonicador da marca VIBRA-CELL modelo VCX. Em seguida, a suspensão resultante foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos, a 4°C, e o sobrenadante armazenado à -16°C para posterior análise de atividade enzimática (hidrólise de tributirina), procedimentos de purificação e concentração de proteína.

3.3.2 Diálise

Em vários experimentos, após rompimento e centrifugação e antes da adsorção, a enzima foi submetida a uma etapa de diálise. O sobrenadante contendo a lipase BTL-2 (obtido conforme item 3.3.1) era então dialisado em membrana de acetato de celulose (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA) contra água mili-Q com no mínimo 6 trocas de água em intervalos de uma hora. O sistema permaneceu sob agitação sendo encerrada a diálise após 24 horas de experimento.

3.3.3 Concentração

Para vários experimentos, utilizou-se também uma etapa de concentração por desidratação da solução enzimática previamente dialisada, antes dos experimentos de adsorção. A solução enzimática dialisada foi inserida em membrana de acetato de celulose (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA) e a membrana foi totalmente coberta por aproximadamente 500 g de açúcar. Foram realizados no mínimo 3 trocas do açúcar e o sistema foi mantido sob refrigeração a 8°C por 24h.

3.3.4 Estudo da Influência do pH na Extração da Enzima Durante a Etapa de Rompimento Celular

A biomassa produzida (1 g massa úmida) foi ressuspensa em 50 mL de tampão a diferentes valores de pHs (citrato de sódio 100 mM pH 5,0; fostato de sódio 100, 50 e 10 mM, pH 8,0, 100 mM pH 6,0 e 7,0; tampão carbonato-bicarbonato 100 mM pH 9,0). As células em suspensão eram submetidas à sonicação com 10 pulsos de 1 minuto (8-10 watts) e amplitude de 20 mHz com intervalo de 30 segundos entre cada pulso utilizando o sonicador da marca VIBRA-CELL modelo VCX. Em seguida, a suspensão resultante foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos, a 4°C, e o sobrenadante era armazenado à -16°C para posterior análise de atividade enzimática (hidrólise de tributirina) e concentração de proteína.

3.3.5 Avaliação da Estabilidade e Atividade Enzimática em Função do pH

Para avaliação da estabilidade da enzima, a solução enzimática dialisada foi diluída em tampão a diferentes valores de pH (citrato de sódio 100 mM pH 4,0 e 5,0; fostato de sódio 100 mM pH 6,0, 7,0 e 8,0; tampão carbonato-bicarbonato 100 mM pH 9,0 e 10,0) na proporção 3:1 v/v (mesma concentração utilizada nos procedimentos de adsorção). As soluções eram submetidas a agitação em shaker orbital à 50 rpm, 25°C por 16 horas e posteriormente eram medidas a atividade enzimática (hidrólise da tributirina) e proteínas totais.

Para avaliação da influência do pH na atividade enzimática, foram utilizados os procedimentos descritos no item 3.2.1 variando os tampões utilizados na medida de atividade hidrolítica (citrato de sódio 100 mM pH 4,0 e 5,0; fostato de sódio 100 mM pH 6,0, 7,0 e 8,0; tampão carbonato-bicarbonato 100 mM pH 9,0 e 10,0) utilizando solução enzimática dialisada.

3.3.6 Síntese de Micropartículas Magnéticas de Sílica (SMMps) e Modificação da Superfície

As micropartículas magnéticas de sílica (SMMps) foram sintetizadas conforme Kopp et al. (2015) em um sistema de microemulsão água-óleo, empregando silicato de sódio como fonte de sílica e nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro como núcleo magnético.

3.3.6.1 Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro (SPION)

A síntese de SPION foi realizada conforme Kopp (2013). Nesse método, foram preparadas soluções de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 350 mM (1000 mL) e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200 mM (1000 mL) usando água destilada previamente fervida por 20 minutos para remoção do excesso de oxigênio. As duas soluções foram misturadas em reator encamisado, sob agitação mecânica. Logo após, 250 mL de solução aquosa de NH_4OH (aq), 28% (m/m), foram adicionados ao reator por meio de uma bomba peristáltica. A solução resultante foi agitada a 60°C e 1000 RPM por 1 hora. As SPIONs formadas foram recuperadas aplicando-se um campo magnético, lavadas com água destilada e armazenadas até o uso.

3.3.6.2 Síntese de Micropartículas Magnéticas de Sílica (SMMps)

Uma solução A foi preparada pela dissolução de silicato de sódio em 100 mL de água destilada para uma concentração final de 1,0 M. Em seguida, a solução de silicato de sódio foi adicionada à 350 mL de ciclohexano 99% contendo 25 mL de Triton X-100 sob agitação até formar uma solução estável. A solução B foi preparada pela adição de 100 mL de sulfato de amônio 1,0 M à 350 mL de ciclohexano 99% contendo 25 mL de Triton X-100. 20g de SPION foram adicionadas à solução A e a mistura resultante foi mantida sob agitação por 3 minutos. Feito isso, a solução B foi transferida para o reator contendo a solução A por uma bomba peristáltica (fluxo - 100 mL / min). A mistura resultante foi mantida sob agitação (1000 rpm) a 25 °C por 1 hora. As SMMps formadas foram então recuperadas pela aplicação de um campo magnético e lavadas com uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v) três vezes e duas vezes com água destilada.

3.3.7 Modificação da Superfície das SMMps e Sílica com Grupos Octil e Amino

A modificação da superfície das SMMps com grupos octil e amino foi realizada em meio orgânico segundo Kopp et al. (2015). Nesse método, 1 grama de SMMp ou sílica mesoporosa comercial ImmoBead S60S previamente ativada com H_2SO_4 0.1 M (refluxo por 2 horas) foi adicionado a 25 ml de tolueno contendo 1,0 mmol de trietoxi(octil)silano 97% (OCTEO) (para grupos octil) ou 1,0 mmol (3-aminopropil)triétoxissilano (para grupos amino).

A solução resultante foi aquecida à 110 ° C sob refluxo por 5 horas. Após esse período, as SMMPs revestidas com grupos octil (SMMP-octil) foram recuperadas magneticamente e lavadas com acetona (1x), etanol (2x) e água destilada (5x). Sílica macroporosa era recuperada por filtração e lavada empregando o mesmo protocolo das SMMps. Todos os materiais resultantes foram secos a 60°C durante 16 horas e em seguida armazenados. Para a síntese de SMMps e Sílica octil ativados com diferentes grupos funcionais o mesmo procedimento padrão era empregado, porém foram adicionadas diferentes concentrações do reagente OCTEO. Para cada grama (massa seca) de material (SMMp ou Sílica) adicionaram-se 0,25 mmol de OCTEO (Sílica ou SMMp octil 25%), 0,50 mmol de OCTEO (Sílica ou SMMp octil 50%), 0,75 mmol de OCTEO (Sílica ou SMMp octil 75%) e 1,00 mmol de OCTEO (Sílica ou SMMp octil 100%).

3.3.8 Estudo da Adsorção de BTL-2 em SMMps ativados com diferentes grupos funcionais

Nesta etapa do trabalho, foram empregadas SMMps ativadas com grupos octil, amino. A influência do pH na adsorção da BTL-2 foi avaliada para os suportes SMMp-octil e SMMP-amino. A solução enzimática dialisada foi diluída em tampão com diferentes valores de pH na proporção 4:1 v/v. Para o suporte SMMp recoberto com grupos octil, o pH foi ajustado através da diluição em tampão (100 mM) em pH 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0. Para o suporte SMMp recoberto com grupos amino, o pH foi ajustado pela diluição em tampão (100 mM) em pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 sendo que a força iônica final foi 25 mM. Antes da adsorção, os diferentes suportes foram equilibrados adicionando-se tampão (25 mM) nos valores de pH mencionados na proporção de 1:10 m/v e mantidos sob agitação a 25°C em shaker orbital (50 rpm) por 1h. Os suportes foram recuperados aplicando-se um campo magnético externo, quantificou-se a umidade retida no suporte determinando-se as massas dos respectivos suportes seco e suporte úmido.

De uma maneira geral, as soluções enzimáticas foram adicionadas ao suporte na proporção de 1:10 m/v e as misturas resultantes foram mantidas sob agitação a 25° C por 16 h em shaker orbital a 50 rpm. Para melhor monitoramento, uma amostra de controle sem suporte foi incubada nas mesmas condições, para todos os experimentos. Ao final, o derivado foi recuperado aplicando-se um campo magnético externo e a atividade enzimática (hidrólise da tributirina) e proteínas totais foram medidas no sobrenadante e comparadas com a solução inicial e o controle.

3.3.9 Cálculo de rendimento de adsorção

O rendimento de adsorção da enzima foi calculado de acordo com as Equações 3 e 4:

$$RA_E(\%) = \frac{At_{Tea}}{At_0} \times 100 \quad (3)$$

$$At_{Tea} = At_0 - At_f \quad (4)$$

Em que At_{Tea} é atividade teoricamente adsorvida, At_0 é a atividade medida na amostra de controle ao final da adsorção e At_f é a atividade medida na solução enzimática separada do suporte ao final da adsorção.

O rendimento de adsorção de proteínas totais foi calculado conforme as Equações 5 e 6:

$$RA_P(\%) = \frac{Pt_0 - Pt_f}{Pt_0} \times 100 \quad (5)$$

$$Pt_{Tea} = Pt_0 - Pt_f \quad (6)$$

Em que Pt_{Tea} é a proteína total teoricamente adsorvida, Pt_0 é a medida de proteínas totais na amostra de controle ao final da adsorção e Pt_f é a medida de proteínas totais na solução enzimática separada do suporte ao final da adsorção.

3.3.10 Cinética de adsorção de BTL-2 em SMMps ativadas com grupos amino e octil

Foi preparada uma solução contendo BTL-2 previamente dialisada e diluída em tampão fostato de sódio pH 7,0 (100 mM) na proporção 3:1 com atividade enzimática final de aproximadamente 50 U_{TBU}/mL . Adicionou-se a solução aos diferentes suportes, previamente equilibrados com o mesmo tampão da adsorção, na proporção de 1:10 m/v. A suspensão foi mantida sob agitação em shaker orbital a 50 rpm e 25° C por 24 h. Foram coletadas alíquotas do sobrenadante em intervalos pré-determinados, medindo-se atividade lipolítica pelo método de hidrólise da tributirina e proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Para ajuste dos dados experimentais, foi utilizado o software SciDavis.

3.3.11 Adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos

Soluções contendo BTL-2 previamente dialisadas e diluídas e foram submetidas à adsorção em diferentes adsorventes: agarose recoberta com grupos octil (agarose-octil comercial), sílica-octil e SMMp-octil (preparados conforme descrito no item 3.3.6). Também foi realizada a adsorção nos suportes sem modificação de química, no caso da sílica e SMMp para se avaliar a influência dos grupos octil na adsorção da lipase.

Antes da adsorção, os diferentes suportes foram equilibrados por incubação em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5mM) na proporção de 1:10 m/v. A mistura resultante foi mantida sob agitação a 25°C em shaker orbital (50 rpm) por 1h. Os suportes foram recuperados por aplicação de um campo magnético externo (SMMps) ou por filtração (sílica macroporosa e agarose). A umidade nos suportes foi quantificada por diferença de massa entre suporte seco e suporte úmido.

A solução enzimática dialisada foi diluída em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (20 mM) na proporção 3:1 v/v para força iônica final 5 mM. A solução foi adicionada ao suporte previamente equilibrado na proporção de 1:10 m/v e as suspensões resultantes foram mantidas sob agitação à 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. Uma solução de enzima sem suporte foi incubada nas mesmas condições para o controle. Ao final, o derivado (suporte+enzima adsorvida) foi recuperado por aplicação de um campo magnético externo (SMMps) ou por filtração (sílica macroporosa e agarose). A atividade enzimática e proteínas totais no sobrenadante (Bradford) durante e após o processo de adsorção foram determinadas para calcular o rendimento de adsorção de enzima e de proteínas conforme as Equações 3 e 5 (item 3.3.9).

3.3.12 Dessorção de BTL-2 de diferentes suportes hidrofóbicos

Para dessorção da enzima do suporte SMMp, SMMp-octil, sílica-octil e agarose-octil foi utilizada solução de Triton X-100 na concentração 0,2% (m/v) preparada em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mM). A solução foi adicionada aos derivados (suporte + enzima) na proporção de 1:10 m/v e a suspensão deixada sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, a 25° C por 1h e 30 minutos. Ao final, o derivado foi recuperado aplicando-se um campo magnético externo (SMMps) ou por filtração (sílica macroporosa e agarose). As medidas de atividade enzimática (hidrólise da tributirina) e de proteínas totais (BCA) do sobrenadante final foram

realizados para o cálculo do rendimento de dessorção de enzima e proteínas conforme o item seguinte.

3.3.13 Cálculo de rendimento de dessorção

Os rendimentos de dessorção da enzima e da proteína foram calculados, respectivamente, de acordo com as Equações 7 e 8:

$$RD_E(\%) = \frac{A_d}{A_{t_{Tea}}} \times 100 \quad (7)$$

$$RD_P(\%) = \frac{P_d}{P_{t_{Tea}}} \times 100 \quad (8)$$

Em que A_d é a atividade medida no sobrenadante ao final da dessorção e $A_{t_{Tea}}$ é atividade teoricamente adsorvida conforme a Equação 4 (item 3.3.9).

P_d é a medida de proteínas totais medida no sobrenadante ao final da dessorção e $P_{t_{Tea}}$ é a medida de proteínas totais teoricamente adsorvidas no suporte conforme a Equação 6 (item 3.3.9).

3.3.14 Adsorção de BTL-2 em SMMp e Sílica com diferentes densidades de grupos octil

Soluções similares de BTL-2, dialisadas, foram submetidas à adsorção nos suportes SMMp e sílica recobertos com 25, 50, 75 e 100% de grupos octil. O preparo dos suportes, a solução de enzima e as condições de adsorção foram as mesmas descritas no item 3.3.11.

3.3.15 Dessorção de BTL-2 Adsorvida em SMMp e Sílica com Diferentes Densidades de Grupos Octil

A dessorção da enzima do suporte SMMp-octil preparado empregando diferentes concentrações de OCTEO foi realizada com soluções de Triton X-100 em diferentes concentrações 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5% (m/v) preparadas em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mM); solução de Triton X-100 0,4% (m/v) preparada em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (25

mM ou 100 mM) com e sem NaCl na concentração de 0,1; 0,25; 0,5 e 0,75 M. A dessorção da enzima do suporte sílica-octil preparado empregando diferentes concentrações de OCTEO era estudada empregando soluções de Triton X-100 nas concentrações de 0,2 e 0,4% (m/v) preparadas em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mM) e solução de Triton X-100 0,4% preparada em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (25 mM) contendo NaCl 0,25 M.

As soluções de dessorção foram adicionadas ao derivado na proporção de 1:5 m/v e a suspensão mantida sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, a 25° C, por 1h, e 30 minutos. Ao final, o derivado foi recuperado por aplicação de um campo magnético externo (SMMps) ou por filtração (sílica macroporosa), realizando-se, então, as medidas de atividade enzimática e proteínas totais (BCA) no sobrenadante final da solução de dessorção para cálculo do rendimento de dessorção de enzima e proteínas conforme as Equações 7 e 8 (item 3.3.13). O fator de purificação (FP) foi calculado conforme a Equação 9:

$$FP(\%) = \frac{AE_f}{AE_0} \quad (9)$$

Em que AE_0 é a atividade específica no controle ao final do processo e a AE_f é atividade específica no sobrenadante dessorvido.

3.3.16 Eletroforese SDS – PAGE

A técnica de eletroforese SDS-PAGE com gel de acrilamida/bis-acrilamida 12% em condições desnaturantes foi realizada segundo Laemmli (1970) em um sistema Amersham™ ECL™ Gel Box (GE Healthcare). O gel de acrilamida/bis-acrilamida 12% Amersham™ ECL™ Gel foi obtido comercialmente. O tampão de corrida foi preparado pela diluição de 19 mL do tampão de corrida Amersham™ ECL™ Gel Running Buffer 10x em 171 mL de água destilada. 90 mL de tampão de corrida em cada tanque do sistema Amersham™ ECL™ Gel Box foram adicionados e o gel foi pré corrido por 12 minutos a 160 V. Em seguida, 6 mL do mesmo tampão de corrida utilizado foram adicionados nos poços de amostra do gel. As amostras das soluções enzimáticas foram adicionadas em diferentes proporções ao tampão de amostras (2,5 mL de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 4,0 mL de SDS 10% (m/v), 2 mL de glicerol, 2 mg de azul de bromofenol e 310 mg de β-mercaptoetanol e água destilada até o volume final de 10 mL). As amostras foram aquecidas por 5 min a 95°C em água fervente. Foram inseridos 15-20 µL de amostras em cada poço, aplicando-se 5 µL do marcador High-range Rainbow

Markers 12-225 KDa (GE Healthcare), como indicador de massa molecular. A corrida do gel foi realizada por 60-90 minutos, ligada em fonte de 160 V (MAJO-MP-250V, Major Science). Após a corrida, o gel permaneceu em uma solução de fixação (100 mL de etanol, 25 mL ácido acético, 125 mL água destilada), por 30 minutos. A revelação dos geis foi realizada com Coomassie Brilliant Blue R-250 (coloração por 30min), usando-se para descoloração solução composta de 250 mL etanol, 80 mL ácido acético e 670 mL água destilada, pelo tempo necessário para descolorir o gel de forma eficiente e clara.

No caso dos derivados (enzima + suporte), aproximadamente 10 mg foram suspensos em 100 μ L de tampão de amostra e aquecidos por 5 min à 95°C. Algumas amostras de enzima solúvel foram concentradas por precipitação com acetona antes de serem misturadas ao tampão de amostra. Para concentração de proteínas, primeiramente foi realizada quantificação de proteínas em solução pelo método de Bradford. Uma vez conhecida a concentração de proteínas totais nas diferentes soluções, foi adicionado um volume conhecido a um tubo eppendorf contendo aproximadamente 200 μ g de proteína, em seguida acetona gelada, até o volume final de 2 mL, mantendo o tubo sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e 100 μ L de tampão de amostra foram adicionados diretamente ao precipitado. A solução resultante foi aquecida por 5 min à 95°C e utilizada para realização do experimento de eletroforese, conforme descrito acima.

3.3.17 Adsorção de Lipase BTL-2 na Presença de Debris Celulares

Nesse experimento, foi avaliado o desempenho das SMMps contendo diferentes graus de ativação com grupos octil na adsorção da BTL-2 na presença de debris celulares. Para obtenção da solução de BTL-2, foi realizado o rompimento celular (conforme item 3.3.1) em pH 8,0 (tampão fosfato de sódio 100 mM), sendo que após o rompimento celular não era realizada a etapa de centrifugação.

Antes da adsorção, os suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% foram lavados com água destilada e posteriormente recuperados aplicando-se um campo magnético externo.

10 mL de solução de rompimento celular contendo debris celulares foram adicionados a 2 gramas de SMMps ativados com diferentes densidades de grupos octil (proporção de 2:10 m/v). As suspensões resultantes foram mantidas sob agitação à 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. Uma solução de debris sem suporte foi mantida sob mesmas

condições para controle. Ao final, o derivado (suporte+enzima adsorvida) foi recuperado por campo magnético externo. Foram realizadas análises de atividade (tributirina) e proteínas totais (Bradford) no sobrenadante da solução de adsorção antes e após o procedimento de adsorção para avaliar o rendimento de adsorção de enzima e proteínas conforme as Equações 3 e 5 (item 3.3.9).

Para dessorção da enzima do suporte, foi realizado primeiramente uma lavagem do suporte com água destilada (10 mL) para retirar as proteínas menos hidrofóbicas adsorvidas no material e para retirar debris celulares que foram capturados pelas partículas do suporte durante a separação magnética. Em seguida, foi realizada a dessorção com Triton X-100 nas condições ótimas para cada um dos suportes SMMp-octil determinadas em experimentos anteriores. Foram utilizadas soluções de Triton X-100 0,4% (m/v) em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mM) para a dessorção dos suportes SMMp-octil 75% e 100% e soluções de Triton X-100 0,4% (m/v) em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (25 mM) contendo NaCl 0,25M para os suportes SMMp-octil 25% e 50%. Os procedimentos de dessorção foram realizados conforme item 3.3.15.

3.3.18 Avaliação de SMMp como Suporte para Imobilização da Lipase BTL-2

Esse experimento teve como objetivo avaliar a adsorção de BTL-2 do ponto de vista de um processo de imobilização de enzimas. Nesse experimento foi avaliada a atividade hidrolítica e de esterificação (formação de butirato de butila) da enzima adsorvida (derivado) aos suportes SMMp-octil, Sílica-octil e Agarose-octil. A adsorção foi realizada conforme os procedimentos descritos no item 3.3.14 e a atividade dos derivados medida por esterificação conforme item 3.2.2 e de hidrólise segundo o item 3.2.1. Também foi medida a atividade por esterificação e hidrólise de tributirina da enzima livre dialisada e concentrada por ultrafiltração conforme descrito anteriormente para que se pudesse relacionar a atividade enzimática da BTL-2 pelos dois métodos, permitindo assim calcular a atividade recuperada no derivado. A atividade recuperada no derivado foi calculada conforme a Equação 10:

$$AR(\%) = \frac{At_{Der}}{At_{Tea}} \times 100 \quad (10)$$

Em que At_{Der} é a atividade medida no derivado por esterificação e At_{Tea} é a atividade teórica adsorvida (Equação 4 conforme item 3.3.9) medida por hidrólise da tributirina e posteriormente relacionada com a atividade de esterificação.

3.3.19 Reação de Esterificação

Nesse experimento era avaliada a cinética de conversão (formação de butirato de butila) ao longo de períodos fixos de tempo utilizando a enzima livre e imobilizada.

Foram realizados ensaios de esterificação empregando BTL-2 Livre e imobilizada nos suportes SMMp-Octil 25, 50, 75 e 100%. O procedimento de imobilização foi realizado conforme descrito no item 3.3.14. Para a reação de esterificação foi oferecida atividade fixa de 1000 U_{EST} das amostras mencionadas nas condições descritas no item 3.2.2. A reação ocorreu por um período de 4 horas e retiradas amostras em intervalos pré-determinados para a quantificação de ácido butírico consumido e, por diferença, a determinação da concentração de butirato de butila formado (conforme item 3.2.2). A conversão percentual foi estimada através da Equação 11:

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{\text{ácido consumido (\mu\text{mol})}}{\text{ácido inicial (\mu\text{mol})}} \times 100 \quad (11)$$

No sistema empregado, a concentração máxima teórica de éster formado (ésteres potencial = concentração inicial de ácido) foi de 1000 μ moles.

Em outro experimento de esterificação, foram utilizados os derivados obtidos pela adsorção direta de BTL2 em debris celulares (descrita no item 3.3.17) e o derivado comercial Lipozym TL IM da Novozymes. Nesse experimento, foi oferecida massa fixa de 1g dos diferentes derivados. O ensaio de esterificação foi realizado nas mesmas condições descritas anteriormente por um período de 24h, retirando-se alíquotas em intervalos de tempo pré-determinados e calculando-se a conversão conforme a Equação 11. Ao fim de 24 horas de reação, as SMMps foram recuperadas magneticamente e lavadas com terc-butanol para reuso em um novo ciclo reacional de esterificação, realizado exatamente nas mesmas condições descritas anteriormente. A Lipozyme foi recuperada por filtração, lavado com terc-butanol e também reutilizado em um novo ciclo reacional. Ao todo foram realizados 5 ciclos de 24 horas com reuso do mesmo derivado e a conversão foi calculada ao fim de cada ciclo conforme descrito anteriormente.

3.3.20 Estudo da adsorção de BTL-2 em SMMp-octil 75% e 100% na presença de etanol

Esse experimento teve como objetivo avaliar a influência da presença de etanol na adsorção de BTL-2 em SMMp-octil 75% e 100%. Os ensaios foram realizados com enzima BTL-2 dialisada e também com o lisado celular cujo rompimento celular foi feito conforme item 3.3.1. O procedimento de adsorção foi realizado conforme o item 3.3.11 tanto para a enzima dialisada quanto para o lisado celular. Foram realizados experimentos com e sem a presença de etanol absoluto (95,5%), sendo que o etanol foi inserido na proporção 10% v/v na solução de imobilização. Os suportes utilizados para adsorção na presença de etanol foram previamente equilibrados por incubação no mesmo na proporção de 1:10 m/v.

Para a dessorção da enzima dos derivados foram utilizadas soluções de Triton X-100 nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 e 1,2% (m/v) em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mM). Os procedimentos de dessorção foram realizados conforme item 3.3.12.

4 RESULTADOS

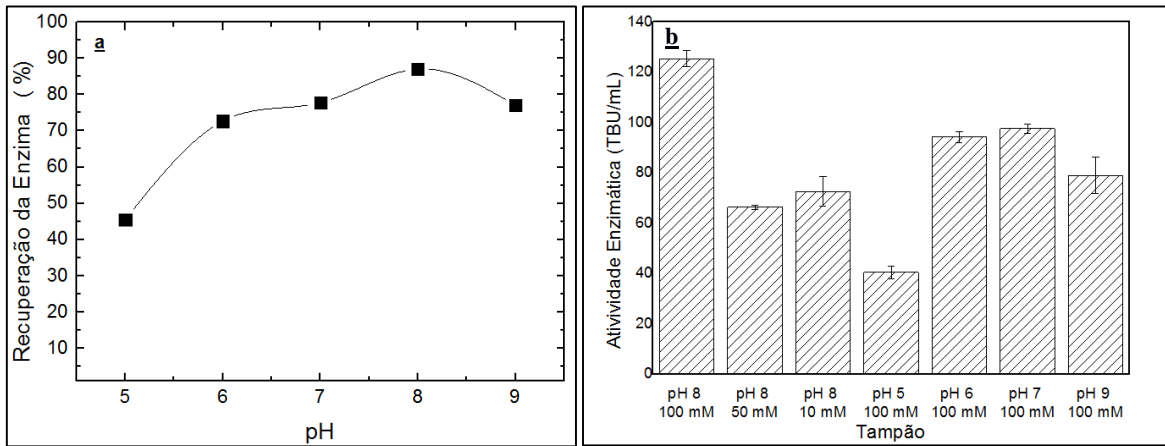
4.1 Influência do pH na Extração da Enzima

Lipase BTL-2 foi produzida intracelularmente por *E.coli* recombinante (VÉLEZ et al., 2013). Assim, a primeira etapa do procedimento de purificação da enzima é o rompimento celular. Nesse contexto, foi selecionado o método de sonicação para o rompimento por ser um procedimento simples e facilmente adaptável a pequenos volumes de reação, tendo já sido testado em nosso grupo para esta lipase (VÉLEZ et al., 2013). O pH, tipo de tampão e a força iônica do meio em que o rompimento celular é realizado pode influenciar significativamente na concentração de enzima ativa no sobrenadante (fração solúvel) ao final do processo, uma vez que dependendo das condições em que o experimento é realizado uma parcela da enzima pode permanecer adsorvida aos debrís celulares (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

A Figura 4.1-a apresenta a porcentagem de enzima recuperada após rompimento celular e centrifugação em função do pH, tampão e força iônica usadas na etapa de rompimento celular/extração. O melhor resultado foi observado em tampão 100 mM pH 8,0 onde foi possível recuperar 87% de toda a enzima contida na biomassa, ou seja apenas 13% da enzima ativa permaneceu aderida aos debrís celulares. Em pH 5,0 foi observado o pior resultado, nesta condição apenas 45% de toda enzima ativa estava totalmente solubilizada no sobrenadante do procedimento de extração.

Uma vez identificada a melhor condição para a realização da etapa de extração da enzima (tampão fosfato de sódio pH 8,0), avaliou-se o efeito da diminuição da força iônica do tampão no processo de rompimento celular. A diminuição da força iônica levou a uma menor concentração de lipase disponível no sobrenadante. A Figura 4.1-b apresenta a atividade enzimática no sobrenadante após centrifugação na etapa de recuperação da enzima. A extração realizada com tampão pH 8,0 100 mM apresentou maior atividade enzimática se mostrando a melhor condição para extração da enzima e foi então utilizada nos demais experimentos. Este resultado mostra a grande importância também da variável força iônica na extração de proteínas para a fase solúvel, já que em pH 8,0 o fato de diminuir o valor da força iônica para 50 e 10 mM diminuiu em muito a eficiência do rompimento celular.

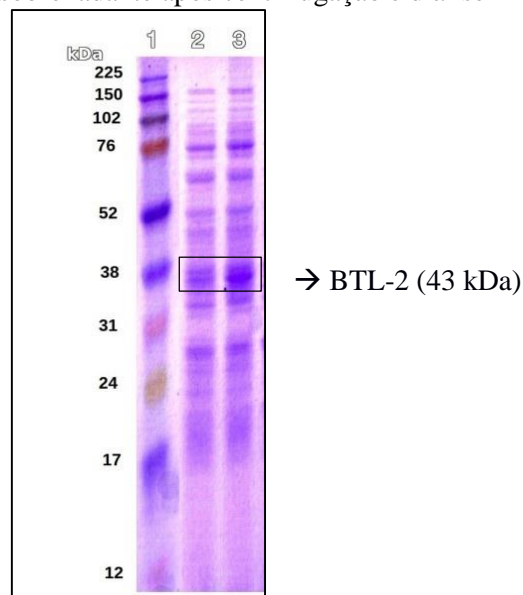
Figura 4.1 - a) Porcentagem de enzima recuperada após sonicação e centrifugação à 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C da biomassa (1 g massa úmida) ressuspensa em 50 mL de tampão a diferentes pHs: citrato de sódio pH 5,0 (100 mM); fosfato de sódio pH 8,0 (10, 50 e 100 mM); pH 6,0 e 7,0 (100 mM); tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 (100 mM). b) Atividade enzimática após sonicação e centrifugação nas condições já descritas pelo método da tributirina a pH 7,5, como descrito no item 3.2.1.



Nas melhores condições de extração, ensaios de diálise foram realizados para facilitar alteração do pH na solução durante os estudos de adsorção da BTL-2 em diferentes valores de pH. A Figura 4.2 apresenta a eletroforese de amostras após procedimentos de rompimento celular, centrifugação e diálise.

Nota-se que não há diferença significativa entre as amostras 2 e 3 uma vez que após a separação dos debrís celulares por sedimentação, a diálise promove apenas a remoção de íons, carboidratos, oligopeptídeos e pequenas proteínas contaminantes mantendo aparentemente o mesmo perfil e quantidade de proteínas na amostra.

Figura 4.2 - Eletroforese SDS-PAGE dos procedimentos de rompimento celular em tampão fosfato pH 8,0 100 mM, centrifugação e diálise. 1- marcador de massa molecular; 2- sobrenadante após centrifugação; 3- sobrenadante após centrifugação e diálise



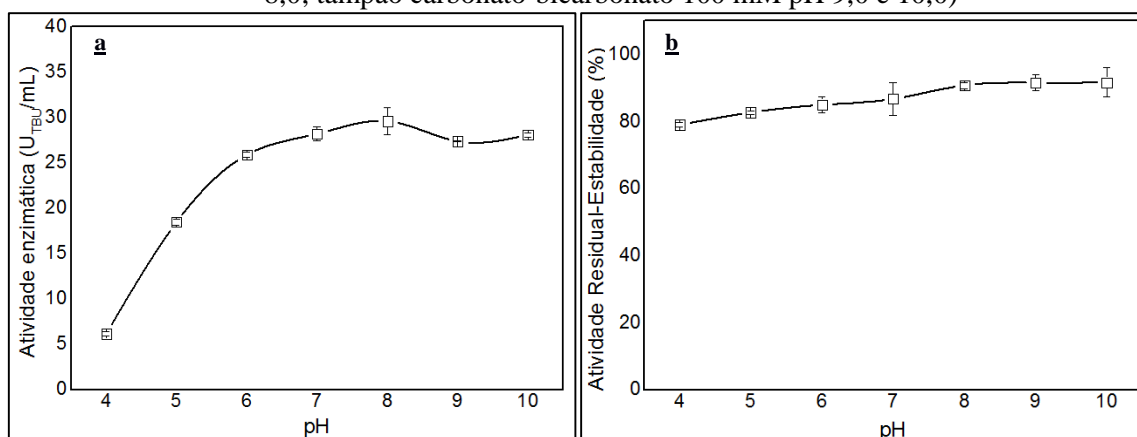
4.2 Avaliação da Estabilidade da Lipase BTL-2 em Diferentes Valores de pH

Em processos de purificação de proteínas por adsorção, o pH é uma das principais variáveis que influenciam no rendimento e na eficiência de adsorção (SCOPE, 2013). Porém, para poder realizar o procedimento de adsorção variando o pH da solução é necessário antes se avaliar a estabilidade da proteína em diferentes valores de pH na temperatura em que se espera realizar o processo. A Figura 4.3-a apresenta os dados de atividade enzimática de BTL-2 (dialisada) realizada pelo método de hidrólise da tributirina em diferentes pHs e os dados de atividade residual da BTL-2 após 16h de incubação quando testada sua estabilidade nas mesmas condições em que seriam realizadas as adsorções (agitação de 50 rpm, a 25 °C por 16 horas) variando o pH de 4,0 a 10,0. A enzima mostrou maior atividade em tributirina, quando a hidrólise foi realizada em pH 8,0. Schmidt-Dannert et al. (1996) também constataram maior atividade da BTL-2 em pH 8,0, quando mediram sua atividade por hidrólise da tributirina a 60°C, entre pHs 5,0-10,0. De forma similar, Rúa et al. (1997) também observaram que a lipase BTL-2 produzida em *E. coli* recombinante apresenta maior atividade em pH 8,0 (tributirina, 60°C). Quyen et al. (2002) produziram a lipase BTL-2 em *Pichia pastoris* e avaliaram sua atividade em função do pH e determinaram que o melhor pH para atividade desta enzima foi 7,5 na hidrólise de tributirina (60°C). Os resultados obtidos, portanto, confirmam os resultados da literatura que mostram que a BTL-2 é uma lipase alcalina.

É possível observar a partir da Figura 4.3-b que a BTL-2 mostrou-se ligeiramente mais estável em pHs alcalinos. Schmidt-Dannert et al. (1996) encontraram resultado semelhante ao testar a estabilidade da enzima por 12h a 30°C. Rúa et al. (1997) avaliaram a estabilidade da BTL-2 em diferentes valores de pH e determinaram também que o pH de maior estabilidade da enzima a 30°C é o pH 10,0, porém a atividade relativa em pH 4,0-5,0 foi muito inferior a observada em nossos experimentos. Este fato pode ter sido causado pelos diferentes substratos usados para medida de atividade enzimática, o palmitato de para-nitrofenil usado pelos autores, em comparação com a tributirina usada em nosso estudo. BTL-2 produzida em *Pichia pastoris* por Quyen et al. (2002) também apresentaram alta estabilidade em valores de pH alcalinos após 14h de incubação a 60°C, com baixa estabilidade em pHs ácidos, diferindo de nossos resultados, neste caso também foi empregado como método de medida de atividade a hidrólise do palmitato de para-nitrofenil, a 60°C. Estudos indicam que o microrganismo utilizado para produção da BTL-2 pode alterar de forma significativa o perfil de atividade da enzima frente à tributirina, o que pode explicar as diferenças nos dados obtidos em nosso estudo e os disponíveis na literatura (QUYEN et al., 2002).

É possível observar que a lipase BTL-2 é consideravelmente estável em todos os valores de pH testados, principalmente em valores de pH alcalinos, conservando aproximadamente 90% de sua atividade inicial após 16 horas de incubação. Desta forma é possível testar a purificação da BTL-2 em uma larga faixa de pH.

Figura 4.3 - a) Atividade enzimática de solução de BTL-2 medida em diferentes pHs por hidrólise da tributirina (citrato de sódio 100 mM pH 4,0 e 5,0; fosfato de sódio 100mM pH 6,0; 7,0; e 8,0; tampão carbonato-bicarbonato 100 mM pH 9,0 e 10,0). b) Atividade residual (condição padrão em pH 7,5) em teste de estabilidade da lipase BTL-2 mantida sob agitação a 50 rpm em shaker orbital, 25°C por 16h em diferentes pHs (citrato de sódio 100 mM pH 4,0 e 5,0; fosfato de sódio 100 mM pH 6,0; 7,0 e 8,0; tampão carbonato-bicarbonato 100 mM pH 9,0 e 10,0)



4.3 Estudo da Adsorção em SMMps Ativados com Diferentes Grupos Funcionais

4.3.1 Estudo da influência do pH na Adsorção em SMMp-octil

Como discutido anteriormente, o pH da solução de imobilização, bem como a força iônica do meio podem influenciar consideravelmente no rendimento de adsorção de uma determinada biomolécula em um suporte poroso (HARRISON et. al., 2003). A Tabela 4.1 apresenta os resultados para adsorção da lipase BTL-2 em suporte SMMp-octil em função do pH do meio de adsorção. É possível observar que a adsorção neste suporte é favorecida em pH 6-7 e desfavorecida em valores de pH alcalinos. O máximo de enzima adsorvida no suporte SMMp-octil (medida de atividade enzimática) foi de 343,11 U_{TBU}/ml suporte em pH 6,0, sendo este valor correspondente a um rendimento de adsorção 65,38%, tendo sido adsorvidos aproximadamente 2,21 mg de proteína por ml de suporte nessa condição. O procedimento de adsorção em SMMp-octil realizado em pH 7,0 apresentou resultado próximo ao observado em pH 6,0 (323,04 U_{TBU}/ml suporte), com adsorção de proteína de 2,46 mg/ml de suporte, um resultado superior ao observado para pH 6,0.

Tabela 4.1 - Adsorção da lipase BTL-2 em SMMp-octil na proporção de 1:10 m/v, força iônica de 25 mM, por 16 h sob agitação em shaker orbital a 50 rpm e 25° C. Controle T_f: solução enzimática sem o suporte nas mesmas condições de adsorção após 16 h. At_{Te}: atividade teórica adsorvida no suporte.

Pt_{Te}: proteína teoricamente adsorvida no suporte. R_{AE}: rendimento de adsorção da enzima. R_{AP}: rendimento de adsorção da proteína. AE₀: atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD}: atividade específica teórica no derivado.

pH	Atividade Controle T _f (U _{TBU} /mL suporte)	At _{Te} (U _{TBU} /mL suporte)	R _{AE} (%)	Proteína Controle T _f (mg/mL suporte)	Pt _{Te} (mg/mL suporte)	R _{AP} (%)	AE ₀ (U _{TBU} /mg proteína)	AE _{TD} (U _{TBU} /mg proteína)
6	521,27	343,11 ± 2,22	65,38 ± 1,05	5,36	2,21 ± 0,09	40,94 ± 1,97	97,34	155,47
7	515,64	323,04 ± 16,04	61,11 ± 0,94	5,40	2,46 ± 0,01	45,10 ± 0,33	96,97	131,46
8	529,93	259,27 ± 2,62	49,18 ± 2,97	5,20	1,76 ± 0,59	31,93 ± 8,71	95,54	147,50
9	506,56	232,56 ± 9,88	45,82 ± 1,82	5,35	2,15 ± 0,37	39,94 ± 6,80	94,63	108,36

É possível notar que para todos os valores de pH testados na adsorção da lipase de BTL-2 em SMMp-octil o R_{AE} foi maior que o R_{AP}, indicando adsorção seletiva da lipase BTL-2 em relação às proteínas contaminantes. Além disso, a atividade específica no derivado após adsorção aumentou em relação ao controle, o que também indica a adsorção seletiva da lipase BTL-2. Esse aumento foi mais acentuado em valores de pH 6,0 e 8,0. A afinidade de lipases por superfícies hidrofóbicas favorece a adsorção nesse suporte, embora as proteínas contaminantes, principalmente proteínas de caráter estrutural, também possam ser adsorvidas por possuírem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Palomo et al., 2004a). A adsorção de proteínas por interação hidrofóbica não varia significativamente com a alteração do pH do meio, pois geralmente adsorventes hidrofóbicos possuem poucos ou nenhum grupo ionizável em sua superfície. No entanto, a solubilidade de proteínas em solução varia consideravelmente com o pH do meio podendo até mesmo precipitar em alguns valores de pH (AMERSHAM, 2001). A BTL-2 possui ponto isoelétrico de 7,2 (SCHMIDT-DANNERT et al. 1997), isso significa que em pH 7,2 a BTL-2 possui carga líquida igual a zero e portanto tem sua solubilidade reduzida, logo era de se esperar que os melhores resultados em termos de adsorção hidrofóbica fossem alcançados nesse valor de pH. A pH 6,0 a carga superficial da enzima não deve ter se alterado sensivelmente, mantendo o mesmo padrão de afinidade pelo suporte. A maioria dos experimentos reportados na literatura para a adsorção hidrofóbica de BTL2 foram realizados em pH 7,0 (PALOMO et al., 2004a; CARRASCO – LÓPEZ et al., 2008; FERNANDEZ – LORENTE et al., 2008; GODOY et. al., 2011). Os demais experimentos foram então realizados em pH 7,0.

Palomo et al. (2004a) reportaram que conseguiram adsorver 100% de lipase BTL-2 em gel de agarose-octil a baixa força iônica (5 mM) condição em que 100% da enzima oferecida (1 mg/g suporte). Os autores relataram ainda que outras proteínas hidrofóbicas do extrato enzimático também adsorveram ao suporte e que a dessorção da enzima usando 0,2% de Triton X-100 permitiu a eluição seletiva da BTL-2, conforme identificada em procedimento de eletroforese SDS-page.

Godoy et al. (2011) relataram um rendimento global de purificação de 95%, obtendo solução de 0,5 mg/mL de lipase BTL2 purificada através de adsorção em butyl-agarose na proporção de (1:10 m/v), a partir de uma solução de 5 mg/mL, por três horas, a temperatura ambiente. A preparação, após lavada abundantemente com água, foi dessorvida em tampão pH 7 contendo 0,5% de Triton X-100 na proporção (1:10) m/v durante 1 h.

Quyen et al. (2002) clonaram o gene da BTL-2 em *Pichia pastoris* para facilitar o processo de purificação da enzima, já que este microrganismo secreta proteínas. Os autores concentraram a enzima por ultrafiltração seguido de adsorção em coluna com butil-sepharose seguido de dessorção com ácido cólico. Nesse estudo, 83% da atividade enzimática foi perdida durante a purificação, mas o fator de purificação alcançado foi de 660 vezes.

4.3.2 Estudo da influência do pH na adsorção em SMMp-amino

SMMps foram ativadas com grupos amino conferindo carga positiva ao material, esse suporte foi então testado na adsorção da lipase BTL-2. A Tabela 4.2 mostra os resultados para a adsorção da lipase em SMMp-amino em função do pH. A melhor adsorção da enzima para o suporte SMMP-amino (370,68 U_{TBU}/ml suporte) ocorreu em pH 7,0 com um rendimento de adsorção de 70,53%, sendo que nesse mesmo pH foi adsorvido 3,38 mg de proteína/ml suporte. O pior resultado em termos de adsorção de atividade e proteínas totais para o suporte SMMp-amino foi observado em pH 5,0. Entretanto, a adsorção em pH 5,0 foi a mais seletiva, ou seja, os valores de atividade específica foram maiores neste pH.

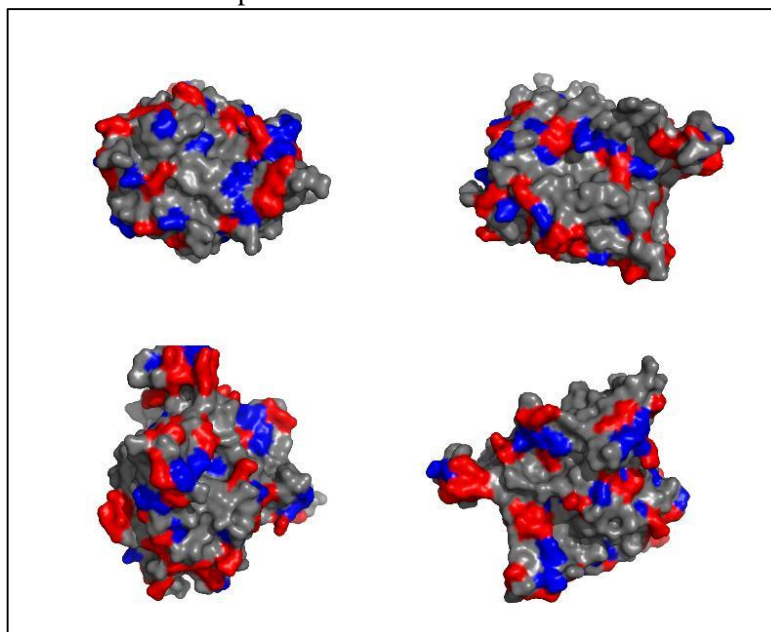
Tabela 4.2 - Adsorção da lipase BTL-2 em SMMp-amino na proporção de 1:10 m/v, força iônica de 25 mM, por 16 h sob agitação em shaker orbital a 50 rpm e 25° C. Controle T_f : solução enzimática sem o suporte nas mesmas condições de adsorção após 16h. A_{T_e} : atividade teoricamente adsorvida no suporte. P_{T_e} : proteína teoricamente adsorvida no suporte. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado.

pH	Atividade Controle T_f (U_{TBU}/mL suporte)	A_{T_e} (U_{TBU}/mL suporte)	RA_E (%)	Proteína Controle T_f (mg/mL suporte)	P_{T_e} (mg/mL suporte)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
5	497,97	232,79 ± 22,95	46,87 ± 4,78	4,20	1,17 ± 0,13	28,10 ± 3,05	118,5	198,15
6	500,45	342,49 ± 10,55	68,44 ± 2,11	4,79	3,03 ± 0,14	63,20 ± 2,85	104,4	113,04
7	525,56	370,68 ± 2,41	70,53 ± 0,85	5,53	3,38 ± 0,07	59,87 ± 0,41	95,1	109,60
8	506,43	331,38 ± 1,16	65,44 ± 0,87	5,03	3,33 ± 0,09	65,83 ± 1,80	100,7	99,40
9	530,39	303,62 ± 17,41	57,23 ± 2,67	5,51	2,65 ± 0,04	47,77 ± 0,77	96,3	114,53

A concentração de enzima adsorvida variou significativamente em função do pH do meio reacional, mais uma vez com o melhor desempenho alcançado em pH 7,0, próximo ao ponto isoelétrico da enzima que é de 7,2 (SCHMIDT-DANNERT et al. 1997). Abaixo do seu ponto isoelétrico, a BTL-2 apresenta carga global positiva e, portanto, baixa tendência de adsorver em suportes carregados positivamente, como o SMMp-amino. No entanto mesmo em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico da proteína a adsorção no suporte foi significativa. Este fato pode ter ocorrido porque a BTL-2 possui uma alta concentração de resíduos de aminoácidos polares negativos em sua estrutura o que em conjunto com seu tamanho relativamente elevado (43 kDa) pode ter facilitado a adsorção em suportes carregados positivamente, mesmo em condições desfavoráveis. Outra possível explicação é o fato da sílica possuir carga fortemente negativa em valores de pH acima de 3 (ILER, 1979; ROSENHOLM et al., 2007). Nesse caso, um recobrimento incompleto ou heterogêneo da superfície do material com grupos amino pode resultar na presença de regiões de carga negativa na superfície do SMMp-amino que podem permitir a adsorção de BTL-2 por troca catiônica, sendo esse fenômeno mais acentuado em baixos valores de pH. A Figura 4.4 mostra as regiões de carga positiva (vermelho) e as regiões de carga negativa (azul) na superfície da BTL-2. Assim como no experimento de adsorção da BTL-2 em SMMp-octil, em suportes carregados positivamente houve aumento na atividade específica no derivado para todas as condições testadas, isso pode indicar uma adsorção mais seletiva da enzima no suporte em relação aos contaminantes. O suporte SMMP-amino apresentou desempenho levemente superior quando comparado ao suporte SMMp-octil.

Schmidt-Dannert et al. (1994) após etapas de concentração da enzima por filtração, extração com hexano, precipitação com etanol e cromatografia em coluna usando sepharose- Q (carga positiva) purificaram a proteína por um fator de 67 vezes, mas com perda de 99,9% da atividade enzimática. Nawani et al. (2005) purificaram uma lipase de *Bacillus sp.* Os autores usaram precipitação com sulfato de amônio, seguido de adsorção em fenil-sepharose (cromatografia em coluna), seguido de cromatografia de permeação em gel, seguido de cromatografia de troca aniônica (sepharose-Q). A enzima foi purificada por um fator de 58 vezes, porém com perda de 90% de toda a atividade enzimática. Schmidt-Dannert et al. (1996) purificaram a BTL-2 a partir do extrato enzimático alcançando um fator de purificação de 329 vezes utilizando duas etapas, cromatografia de troca-iônica em colunas Q- e S-sepharose e cromatografia hidrofóbica em coluna phenyl-sepharose, neste estudo apenas 51% da atividade enzimática foi perdida durante o processo de purificação. Os resultados disponíveis na literatura mostram que a BTL-2 adsorve de forma eficiente em materiais carregados positivamente.

Figura 4.4 - Estrutura tridimensional da BTL-2 mostrando os resíduos de aminoácidos carregados positivamente (vermelho) e negativamente (azul). A figura foi modelada a partir da estrutura 2w22 disponível no Protein Data Bank

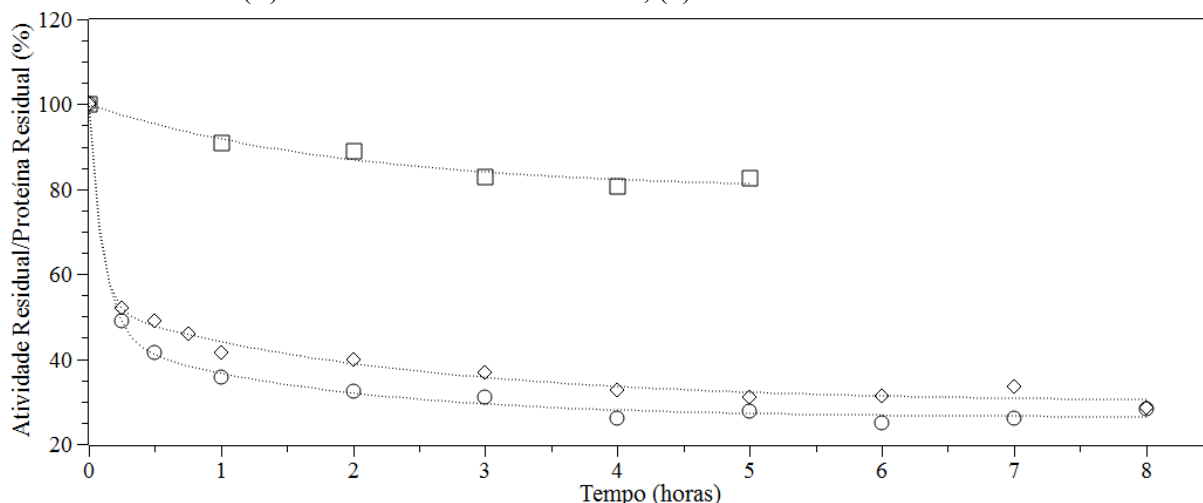


4.3.3 Influência do Tempo na Adsorção

Uma vez determinada a melhor condição de pH para a adsorção da lipase de BTL-2 nos diferentes suportes testados, foi levantada a influência do tempo na adsorção da enzima nestes suportes a fim de determinar o tempo necessário para realização do procedimento

de adsorção. Os testes de adsorção da BTL-2 em SMMP-octil foi realizada em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0. Como pode ser observado na Figura 4.5 o equilíbrio de adsorção foi atingido após aproximadamente 6 horas de incubação, neste ponto foi possível medir no sobrenadante aproximadamente 25% da atividade enzimática oferecida inicialmente.

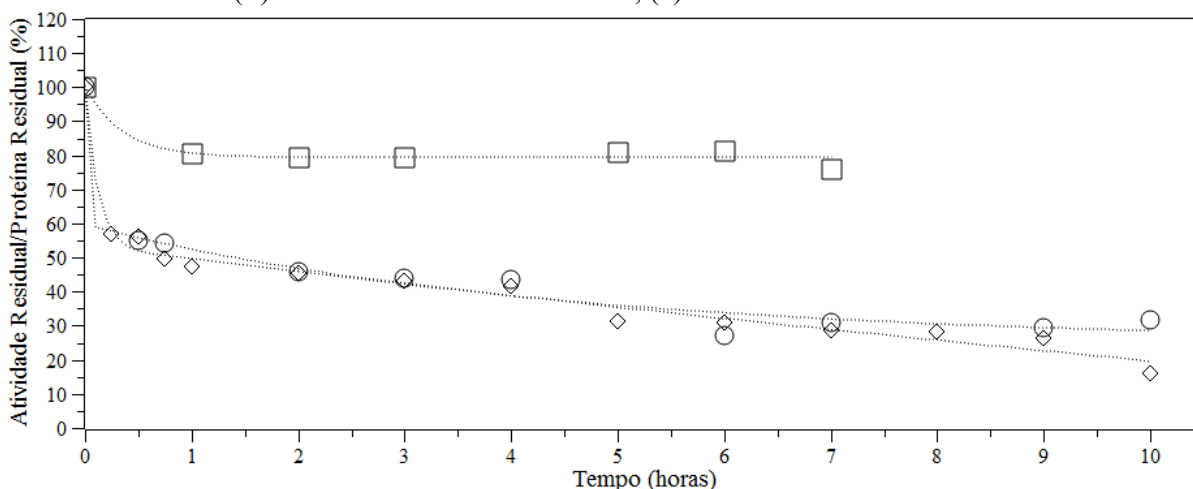
Figura 4.5 - Influência do tempo de adsorção da BTL-2 em SMMP-octil na proporção 1:10 m/v, pH 7,0 (25 mM), sob agitação a 25°C por 8 h em shaker orbital a 50 rpm. (○) Atividade residual no sobrenadante. (□) Atividade residual no controle; (◇) Proteína total residual no sobrenadante



Os testes de adsorção da BTL-2 em SMMp-amino também foram realizados em tampão fosfato 25 Mm pH 7,0. De acordo com a Figura 4.6 o equilíbrio de adsorção também foi atingido em torno de 6 horas de reação, ponto em que foi possível ser medido aproximadamente 35% da atividade enzimática comparada à atividade inicial.

Palomo et al. (2004a) adsorveram 100% da lipase BTL-2 oferecida (1 mg/g suporte) em gel de agarose-octil a baixa força iônica (5 mM) em um período de 1 hora. Bolivar et al. (2009) adsorveram lipase BTL-2 por um período de quatro dias nos suportes MANAE-agarose e amino-epóxi-agarose à pH 7,0 com atividade medida por hidrólise do p-NPB a 25°C. Aproximadamente 20% de atividade foi adsorvida ao suporte MANAE-agarose em 4 dias de adsorção enquanto o amino-epóxi-agarose adsorveu aproximadamente 90% de atividade em 4 dias de adsorção.

Figura 4.6 - Influência do tempo de adsorção da BTL-2 em SMMP-amino na proporção 1:10 m/v, pH 7,0 (25 mM), sob agitação a 25°C por 10 h em shaker orbital a 50 rpm. (○) Atividade residual no sobrenadante. (□) Atividade residual no controle; (◇) Proteína total residual no sobrenadante.



4.4 Adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos

Após estudos da adsorção da BTL-2 em SMMp recoberto com grupos octil, amino e IDA, foi selecionado apenas um desses suportes para seguir com propósito de purificação da BTL-2. De uma maneira geral pode-se afirmar que todos os suportes testados apresentaram desempenhos similares na adsorção da BTL-2. No entanto, o aumento da atividade específica no derivado após a adsorção, que é um indicador direto da capacidade de um determinado suporte adsorver de forma seletiva a molécula alvo, foi mais acentuado para o suporte SMMp-amino e principalmente para o SMMp-octil. Neste contexto, a adsorção em suporte SMMp-octil tende a ser mais seletiva. Tendo em conta também a existência na literatura de vários trabalhos que reportam a purificação e imobilização de lipases e da própria BTL-2 em suportes hidrofóbicos (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2008; QUYEN et al., 2004; GODOY et al., 2011a; GODOY et al., 2011b; MARCIELLO et al., 2013; CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009; RÚA et al., 1997; SCHMIDT-DANNERT et al., 1994; SCHMIDT-DANNERT et al., 1996) selecionado o suporte SMMp-octil para dar continuidade aos estudos e, principalmente, comparar o seu desempenho com outros suportes hidrofóbicos comumente citados na literatura. Foram selecionados também os suportes agarose-octil e sílica ativada com grupos octil (sílica-octil) para comparação direta com o SMMp-octil nos testes de adsorção de BTL-2 nesta etapa do trabalho. Também foi realizada a adsorção nos suportes sem modificação de sua superfície, no caso da sílica e SMMp, para se avaliar a influência do grupo octil na adsorção da lipase nestes suportes. As adsorções foram realizadas segundo metodologia descrita no item 3.3.11.

Tendo em consideração o efeito do tempo de adsorção de BTL-2 em SMMp-octil realizada neste trabalho, foi decidido padronizar os tempos de adsorção da lipase nos suportes para 6 horas. Outra condição de adsorção alterada foi a força iônica final do tampão de diluição da enzima que passou a ser de 5 mM em pH 7,0, tendo em vista os trabalhos já reportados na literatura que usam adsorção de lipase BTL-2 em pH 7,0. A baixa força iônica pode ser utilizada como uma forma de aumentar a seletividade de adsorção da lipase em suportes hidrofóbicos (PALOMO et al., 2002; PALOMO et al., 2004a; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2014 CARRASCO-LÓPEZ et al., 2008; QUYEN et al., 2004; GODOY et al., 2011a; GODOY et al., 2011b; MARCIELLO et al., 2013; CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009; RÚA et al., 1997; SCHMIDT-DANNERT et al., 1996).

A Tabela 4.3 apresenta os resultados de adsorção da lipase BTL-2 em SMMp e sílica macroporosa sem recobrimento, agarose-octil e em SMMp e sílica ativadas com 1 mmol de OCTEO/g de material – ativação de 100% da superfície. É possível observar que a agarose-octil apresentou o melhor RA_E , 93%, correspondendo a 349,10 U_{TBU}/mL suporte. Isso já era esperado, pois o agarose-octil é um suporte hidrofóbico com características ótimas e tem sido amplamente utilizado para a purificação de BTL2 (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2008; GODOY et al., 2011b; CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009). Condições ótimas de purificação seletiva a partir de extrato bruto de BTL2 proveniente de *E. coli* em agarose-octil foram já relatadas na literatura por Palomo et al. (2004a). Esses autores reportam adsorção de 100% da enzima oferecida no gel, a baixa força iônica (5 mM), pH7,0, com dessorção de 100% de BTL-2 usando 0,2% de Triton X-100. Após dessorção com Triton X-100 a enzima foi diluída e adsorvida em DEAE-agarose a pH 8,0 e lavado com água destilada para retirar o detergente, a enzima foi então dessorvida, dialisada e concentrada 10x em filtro Centrikon. Esse protocolo permitiu a recuperação de BTL-2 com alto grau e pureza. Os resultados observados para os demais suportes hidrofóbicos neste trabalho indicam, em um primeiro momento, que o melhor desempenho foi alcançado pela Sílica-octil (RA_E de 56%). É importante, contudo, se ter em conta que para aplicações de adsorventes, principalmente em escala industrial, o volume ocupado pelo adsorvente é muito mais importante que sua massa. Todos os experimentos foram realizados fixando a massa dos adsorventes mas, visando a uma comparação mais realista entre eles, foi determinado o grau de empacotamento de cada um dos adsorventes testados, para permitir a expressão da proteína e da atividade enzimática adsorvidas por mL de suporte. Nessa base, SMMp-octil-100% se mostrou o melhor suporte para adsorção, depois de agarose-octil, pois embora apresente RA_E de 47,91%, inferior ao da sílica-octil (56,79%), tem maior

capacidade de adsorção por volume de suporte 189,45 U_{TBU}/ml , já que ocupa menor volume por massa de suporte.

Tabela 4.3 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp e sílica sem recobrimento, SMMp-octil, e sílica-octil e agarose-octil na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

Suporte	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
SMMp	119,67±18,45	1,66±0,15	30,76±0,79	32,11±3,5	74,74	71,88
SMMp-octil	189,45±15,25	2,38±0,28	47,91±4,65	43,75±2,06	73,13	79,90
Sílica	122,72±19,21	2,52±0,11	60,93±9,61	69,52±2,76	55,53	48,54
Sílica-octil	122,15±15,45	1,14±0,38	56,79±4,15	36,23±7,92	69,71	112,72
Agarose-octil	349,10±32,19	3,02±0,38	92,93±1,10	60,26±7,76	74,85	117,31

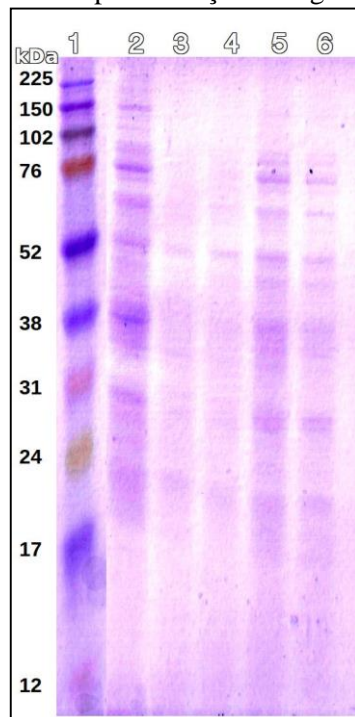
De forma interessante, SMMp e sílica, mesmo sem recobrimento com grupos octil, apresentaram adsorção da enzima de 119,67 U_{TBU}/ml e 122,72 U_{TBU}/ml , respectivamente, atingindo RA_E de 30,76% e 60,93%, respectivamente. Isso confirma a hipótese levantada nos experimentos anteriores de que o suporte SMMp apresenta carga negativa devido aos grupos silanóis presentes na superfície do material, adsorvendo BTL-2, devido à grande densidade de grupos carregados positivamente em sua superfície (Figura 4.4). Segundo Iler (1979) sílica porosa tem ponto de carga zero em pH 2,0 e PI em pH 3,0, logo acima de pH 3,0 a sílica se encontra negativamente carregada. A densidade e quantidade de grupos silanóis carregados negativamente na superfície de sílica porosa pode variar consideravelmente em função do pH dependendo do método de síntese do material (ROSENHOLM et al., 2007; ILER, 1970, BRINKER & SCHERER, 2013). Basicamente, dois tipos de grupos silanóis podem ser encontrados neste tipo de material, os grupos $\equiv Si-OH$ (grupos Q_3) que tem pKa de aproximadamente 3.0 e os grupos $=Si-(OH)_2$ (grupos Q_2) que tem pKa entre 8.0 e 8.5 (ROSENHOLM et al., 2007; ILER, 1970; BRINKER & SCHERER, 2013). Então, em pH 7,0, a quantidade de grupos Q_3 é o que determina a carga negativa do material. No caso da sílica porosa comercial empregada neste estudo não sabemos qual processo de síntese foi utilizado, porém as SMMps foram sintetizadas em meio aquoso, com posterior tratamento com HCl e sem tratamento térmico. O método de síntese utilizado aqui para SMMp favorece a presença de grupos silanóis do tipo Q_3 , altamente negativos. Estudos têm mostrado que a carga negativa gerada pela ionização de silanol Q_2 e Q_3 na superfície de sílicas porosas gera grupos negativos

comparáveis ao mesmo material ativado com grupos – COOH (ROSENHOLM et al., 2007). BTL-2 tem PI de 7.2 (RÚA et al., 1997), o que significa que acima deste pH ela se encontra carregada negativamente e que em valores próximos deste pH ela se encontra menos solúvel, tendo desta forma tendência a se agregar ou se adsorver em superfícies. A adsorção da BTL-2 nos diferentes suportes foi realizada em condições de baixa força iônica visando favorecer competitivamente a lipase, que deve ter maior capacidade de interação com superfícies hidrofóbicas que as demais proteínas presentes em solução. A condição de baixa força iônica do meio em conjunto com as cargas negativas na superfície da sílica e SMMps não ativadas, além do pH empregado na reação, próximo ao PI da enzima, favoreceu o estabelecimento de interação iônica entre os grupos negativos da sílica e positivos de BTL-2.

Dentre os suportes testados, a agarose-octil foi o que adsorveu a lipase de forma mais seletiva sendo que a atividade específica passou de 74,85 U_{TBU}/mg de proteína na solução de adsorção oferecida para 117,31 U_{TBU}/mg no derivado (enzima adsorvida ao suporte). A afinidade de lipases por superfícies hidrofóbicas favorece a adsorção nesses suportes e o aumento da atividade específica no derivado indica que houve adsorção seletiva da BTL-2 em relação as proteínas contaminantes.

A Figura 4.7 mostra a eletroforese dos sobrenadantes da adsorção de BTL-2 em alguns suportes hidrofóbicos. Pode-se, desta forma, perceber, a partir da eletroforese, que os suportes SMMp e SMMp-octil adsorveram mais proteínas em relação à sílica-octil e agarose-octil já que as bandas verificadas nestes experimentos ficaram mais claras indicando menor concentração de proteína. No entanto, através dos valores de atividade específica observados nos derivados na Tabela 4.3 conclui-se que as adsorções em sílica-octil e agarose-octil foram mais seletivas em relação à BTL-2, já que a atividade específica aumentou. A lipase BTL-2 possui massa molecular de 43 kDa. Não foi possível distinguir com clareza a presença de banda correspondente a essa lipase nos sobrenadantes após adsorção, no entanto pode ser observada uma banda forte no controle da reação, logo acima do marcador de 38 kDa, que pode ser assinalada a BTL-2. O desaparecimento desta banda nos demais experimentos é um indicador do sucesso na adsorção da BTL-2 nos diferentes suportes.

Figura 4.7 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos aplicando 20 μ L de amostra preparada em tampão de ruptura (1:1 v/v) em cada poço. 1- marcador de massa molecular; 2- controle ao fim do experimento; 3-sobrenadante após adsorção em SMMp; 4- sobrenadante após adsorção em SMMp-octil; 5-sobrenadante após adsorção em sílica-octil; 6- sobrenadante após adsorção em agarose-octil



4.4.1 Dessorção da BTL-2 em Diferentes Suportes Hidrofóbicos

Para dessorção da enzima do suporte foi utilizado o surfactante Triton X-100. Fernandez-Lorente et al. (2008) alcançou 100% de dessorção de lipase BTL-2 do suporte agarose-octil utilizando a concentração de 0,2 % (m/v) de Triton X-100. Em vista disso, essa concentração de 0,2% Triton X-100 foi selecionada inicialmente para testar a dessorção dos suportes SMMp, SMMp-octil, sílica-octil e agarose-octil conforme metodologia descrita no item 3.3.12. Os resultados da dessorção encontram-se na Tabela 4.4.

Agarose-octil apresentou maior rendimento de dessorção de enzima, 93,93%, que equivale a 297,47 U_{TBU}/ml enquanto SMMp-octil teve rendimento de dessorção de enzima de 16,58% (31,57 U_{TBU}/ml). Não houve dessorção de enzima da sílica-octil. O método de dessorção empregado foi um método comumente utilizado para dessorver proteínas adsorvidas em materiais por interação hidrofóbica. Nesse método, a interação hidrofóbica é desfeita por efeito de uma molécula anfifílica, no caso o Triton X-100. A alta hidrofobicidade do SMMp-octil e sílica-octil pode ter dificultado a dessorção da enzima do suporte, já que a concentração de 0,2% (m/v) de Triton X-100 não foi suficiente para dessorver completamente a enzima de

nenhum dos suportes. Embora o SMMp-octil tenha obtido uma baixa dessorção, ele apresentou a maior seletividade na dessorção, tendo o seu sobrenadante final apresentado uma atividade específica de 464,6 U_{TBU}/mg. Esse resultado representa um fator de purificação da enzima de 6,7 vezes enquanto a agarose-octil obteve um fator de purificação após a dessorção de 2,3 vezes. Esses resultados indicam que a interação hidrofóbica entre a BTL-2 e a sílica e SMMps ativados com grupos octil é muito intensa, em comparação com a interação feita com o agarose-octil. As condições empregadas na ativação da sílica e SMMps com grupos OCTEO permitem um recobrimento máximo do suporte com grupos octil originando materiais extremamente hidrofóbicos (KOPP et al., 2015). Já o agarose-octil, apesar de possuir grupos hidrofóbicos, apresenta também grupos hidrofílicos em sua estrutura, sendo, portanto um adsorvente muito menos hidrofóbico quando comparado à sílica e SMMps ativados com grupos octil. Desta forma, pode-se afirmar que as condições de dessorção empregadas, sobretudo a concentração de Triton X-100 utilizada, foi eficiente para a dessorção da BTL-2 do agarose-octil, mas não foi suficiente para dessorver a enzima dos suportes sílica-octil e SMMp-octil. Outro fator que pode ter dificultado a dessorção da enzima dos suportes ativados com OCTEO é a possibilidade da existência de interações iônicas entre grupos silanol negativamente carregados remanescentes do processo de ativação e regiões de carga positiva da BTL-2, pois a condição de baixa força iônica empregada neste experimento pode ter facilitado essa interação (ROSENHOLM et al., 2007; ILER, 1970; BRINKER & SCHERER, 2013).

Tendo em conta a grande tendência demonstrada pela BTL-2 de formar agregados quando em solução (Palomo et al., 2004b), a enzima pode também ter se adsorvido em múltiplas camadas na superfície do suporte, sendo essas interações hidrofóbicas proteína-proteína mais fáceis de serem quebradas por efeito do Triton X-100. Este efeito de adsorção em múltiplas camadas também pode explicar o desempenho do processo de dessorção, principalmente para o SMMp-octil. Palomo et al. (2004b) reportaram a tendência natural das lipases de formarem agregados por meio de interações entre as superfícies hidrofóbicas que rodeiam o sítio ativo das lipases. Palomo et al. (2004b) usaram a hipótese de que a imobilização de uma lipase num suporte com o sítio ativo exposto ao meio iria permitir a adsorção de moléculas de outra lipase na lipase imobilizada através de um mecanismo semelhante ao que produz agregados bimoleculares. Nesse mesmo trabalho, foi utilizado um derivado de lipase de *P. fluorescens* (PFL) imobilizada em glioxil-agarose para purificar um extrato de BTL-2 proveniente de *E. coli* previamente centrifugado. Uma amostra de 1 mg de proteína por grama de suporte da lipase BTL-2 foi oferecida ao imobilizado PFL, e 95% da atividade foi adsorvida. Para dessorção completa da BTL-2 do imobilizado PFL foi necessário 0,6% de Triton X-100.

De forma bastante interessante, o suporte SMMp sem recobrimento, usado como controle neste experimento apresentou rendimento de dessorção de 53%, porém com pouca atividade dessorvida por unidade de volume de suporte (57,32 U_{TBU}/ml).

Tabela 4.4 - Dados da dessorção da Lipase BTL-2 dos suportes SMMp, sem recobrimento, SMMp-octil, e sílica-octil e agarose-octil utilizando Triton X-100 0,2 % (m/v), pH 7,0 (5 mM), na proporção de 1:10 m/v sob agitação a 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. RD_E: rendimento de dessorção de enzima. RD_P: rendimento de dessorção de proteína. AE₀: atividade específica no controle ao final do processo. AE_f: atividade específica no sobrenadante dessorvido.

Suporte	Atividade Dessorvida (U _{TBU} /ml suporte)	Proteína Dessorvida (mg/ml suporte)	RD _E (%)	RD _P (%)	AE ₀ (U _{TBU} /mg)	AE _f (U _{TBU} /mg proteína)
SMMp	57,32±14,33	0,153±0,018	53,76±13,44	8,62±1,02	68,98	375,8
SMMp-octil	31,57±4,45	0,068±0,006	16,58±2,34	2,98±0,26	68,98	464,6
Sílica-octil	0	0,009±0,001	0	1,01±0,15	68,98	0
Agarose-octil	297,47±3,87	1,803±0,107	93,93±1,22	52,37±3,10	68,98	165,03

Segundo Fernandez-Lorente et al. (2008), a força de adsorção é determinada pelas características do suporte (tais como, hidrofobicidade da superfície de suporte, tamanho e geometria dos poros do suporte) e também pelas características da lipase (tamanho da tampa, número de resíduos hidrofóbicos e localização destes resíduos hidrofóbicos). Nesse mesmo trabalho, a lipase BTL-2 foi imobilizada em quatro suportes hidrofóbicos diferentes (hexil- e butil-toyopearl e butil- e octil-agarose). A BTL-2 imobilizada nos diferentes suportes foi incubada a concentrações crescentes de detergente Triton X-100 para se medir a quantidade necessária de detergente para dessorver 100% da enzima. A lipase dessorveu mais facilmente dos suportes agarose sendo, 0,2% de Triton X-100 para octil, 0,3% para butil, 0,4% para hexil-toyopearl e 0,6% para butil-toyopearl. Em ambos os casos, a BTL-2 adsorvida sobre os suportes ativados com menor densidade de grupos hidrofóbicos necessitou maior quantidade de detergente para ser dessorvida. Ainda segundo os autores, curiosamente, o suporte Toyopearl adsorveu mais fortemente a enzima, embora as suas fibras sejam muito finas, sendo mais difícil de estabelecer um grande número de interações enzima-suporte, ao contrário da agarose, que possui uma larga superfície para a interação. Os resultados sugerem que não somente a hidrofobicidade da superfície do suporte, mas também a morfologia da superfície pode definir a força da adsorção de uma lipase.

Dessa forma, a lipase ao se adsorver em diferentes suportes hidrofóbicos pode adotar congruências geométricas diferentes, podendo envolver mais ou menos grupos da enzima no processo de adsorção, adsorvendo mais fortemente ou não em diferentes suportes (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008). Vale ressaltar que a sílica, a agarose e os SMMps são materiais com estrutura química, física e morfológica muito diferentes. Os SMMps, por exemplo, possuem estrutura de poros não interconectados e pouco uniformes, além disso os poros côncavos do material podem facilitar a interação com biomoléculas em mais de uma dimensão (na agarose essa interação ocorre em apenas uma dimensão) aumentando a força da interação hidrofóbica (KOPP, 2013).

4.5 Adsorção de BTL-2 em SMMp Ativado com Diferentes Densidades de Grupos Octil

Os resultados obtidos até então mostraram que o melhor suporte para adsorção de BTL-2 foi agarose-octil, tendo sido também o único suporte que permitiu dessorver de forma eficiente a enzima. Isso se deve, possivelmente, à menor hidrofobicidade do agarose-octil em comparação com a sílica e SMMp ativados com grupos octil. Tendo em vista que o suporte SMMp-octil utilizado aqui foi ativado com a máxima ativação possível-100%, com o intuito de melhorar o desempenho da adsorção da BTL-2 em SMMp, modificou-se a densidade de grupos octil na superfície do suporte, ativando-o com as porcentagens teóricas de 25%, 50% e 75% de grupos octil por ativação com diferentes concentrações de OCTEO, conforme item 3.3.7. As condições de adsorção foram realizadas conforme o item 3.3.14. Os resultados encontram-se na Tabela 4.5.

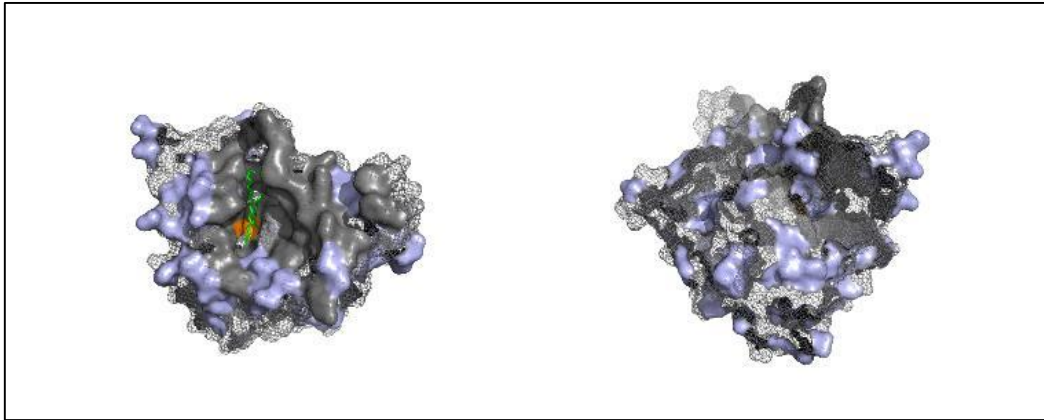
Tabela 4.5 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

SMMp-octil	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)	Umidade (g/g suporte)
25%	210,14±39,16	1,62±0,22	51,95±4,7	28,29±3,25	70,48	133,17	1,46
50%	220,98±55,76	1,78±0,31	54,58±10,2	31,42±7,59	70,48	123,11	1,48
75%	374,33±44,52	4,54±0,20	92,87±1,7	79,28±3,73	70,48	82,50	1,63
100%	189,45±15,25	2,38±0,28	47,91±4,65	43,75±2,06	73,13	79,90	0,62

Os resultados obtidos confirmam a hipótese da necessidade de menor hidrofobicidade no suporte, pois o suporte SMMp ativado com 75% de grupos octil se mostrou a melhor condição para a adsorção alcançando RA_E de 92,87% e 374,33 U_{TBU}/ml suporte adsorvidas, resultado similar ao alcançado com o suporte comercial agarose-octil. As condições com 25% e 50% de grupos octil alcançaram também bons desempenhos e apresentaram atividade 210,14 e 220,98 U_{TBU}/ml suporte, respectivamente. O suporte SMMp-octil 25% se mostrou ser o mais seletivo na adsorção da lipase, apresentando atividade específica no derivado de 133,17 U_{TBU}/mg de proteína (resultado superior a agarose-octil). Observa-se que à medida que se aumentou a densidade de grupos octil (aumento da hidrofobicidade) aumentou a atividade de enzima adsorvida, até a densidade de 75%. Já no SMMp-octil 100% o alto grau de hidrofobicidade dificultou a adsorção conduzindo a piores resultados.

Como introduzido anteriormente, o desenvolvimento de suportes ativados com densidades menores de grupos octil teve como objetivo imitar a superfície do suporte agarose-octil que apresenta grupos octil, hidrofóbicos, e grupos hidroxila, hidrofílicos distribuídos sob a superfície do material. O suporte SMMp ativado com 1 mmol de OCTEO/g de material (octil 100%) é extremamente hidrofóbico aglutinando-se em solução aquosa, o que pode dificultar a difusão da solução aquosa no interior de seus poros. A redução da densidade dos grupos octil pode, desta forma, favorecer o acesso da solução enzimática à superfície do adsorvente. Esse fato pode ser comprovado pelos dados da Tabela 4.5, que mostram a quantidade de tampão absorvida pelos diferentes suportes SMMp-octil na fase de equilíbrio dos mesmos (massa de tampão adsorvido por massa de suporte). Pode-se observar que SMMp-octil 100% absorveu apenas 0,62 g tampão/g suporte, enquanto que os demais absorveram na faixa de 1,4 a 1,6 g tampão/g suporte. No caso dos suportes ativados com 25 e 50% de grupos octil é provável que a concentração de grupos hidrofóbicos na superfície do material não tenha sido suficiente para capturar grandes quantidades da enzima por interação hidrofóbica, embora estes suportes tenham sido mais seletivos na adsorção. O fato de possuir concentrações moderadas de grupos hidrofóbicos em sua superfície pode ter favorecido significativamente a adsorção da BTL-2 na superfície do material em relação a outras proteínas. Como pode ser observado na Figura 4.8 a BTL-2 é uma lipase grande (43 kDa) e possui altíssima densidade de grupos hidrofóbicos em sua superfície, principalmente na região da cavidade catalítica e da tampa (*lid*) (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009). Por outro lado, a redução na densidade de grupos hidrofóbicos na superfície de SMMps também diminuiu o número de sítios de ligação possíveis para a lipase e outras proteínas, o que conseqüentemente diminuiu o rendimento de adsorção e também a quantidade de lipase e outras proteínas adsorvidas ao material.

Figura 4.8 - Regiões hidrofóbicas na superfície da BTL-2. Em cinza encontram-se os aminoácidos hidrofóbicos diretamente relacionados com a atividade catalítica (Lid e cavidade catalítica) e em azul os demais aminoácidos hidrofóbicos. Na figura é possível visualizar os aminoácidos do sitio ativo (laranja) e duas moléculas de Triton X-100 unidas à cavidade catalítica da enzima (verde)



As Figuras 4.9 e 4.10 apresentam os gráficos da atividade adsorvida e rendimento de adsorção de enzima, respectivamente, nos diferentes suportes ativados com grupos octil. É possível observar que o suporte SMMp-octil 75% alcançou desempenho um pouco superior à agarose-octil evidenciado o grande potencial de uso deste suporte para a purificação de proteínas hidrofóbicas.

Figura 4.9 - Gráfico da atividade de BTL-2 adsorvida nos suportes agarose-octil, sílica-octil e SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm

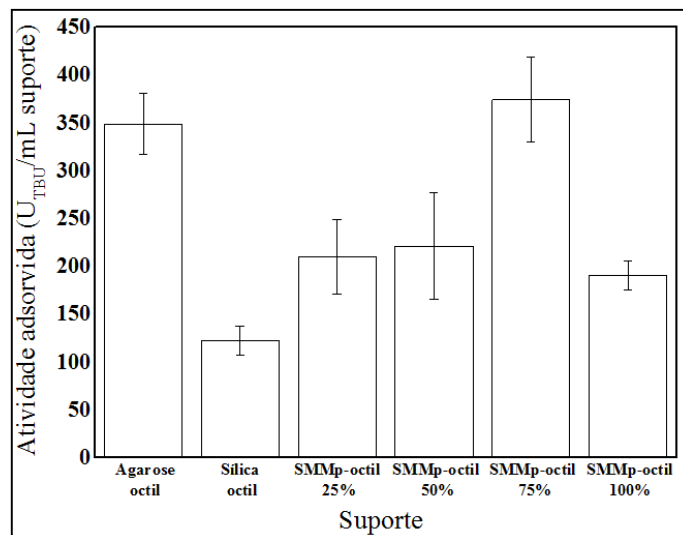
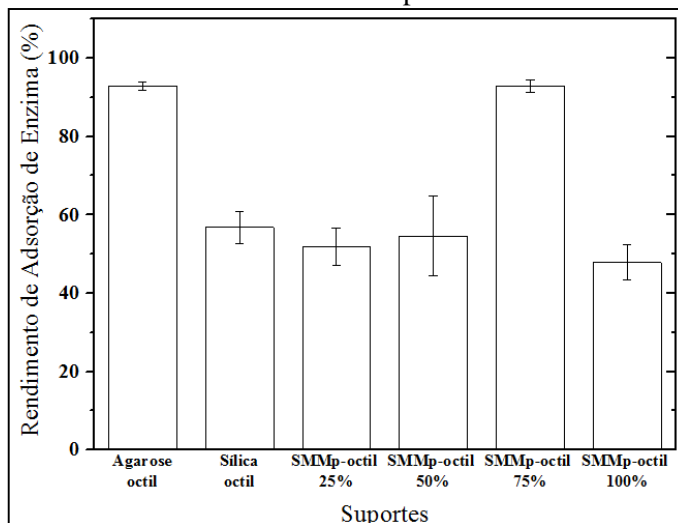


Figura 4.10 - Gráfico do rendimento de adsorção de BTL-2 nos suportes agarose-octil, sílica-octil e SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm.



A maioria dos trabalhos descritos na literatura que tratam da purificação da BTL-2 emprega sistemas de purificação complexos divididos em várias etapas, a cromatografia em coluna tem sido a técnica mais utilizada para essa finalidade. Rúa et al. (1997) purificaram a BTL-2 por adsorção em coluna (cromatografia) preenchida com butil-sepharose em pH 8,0 na presença de NaCl 0,1 M, seguido de eluição com ácido cólico, concentração da enzima por ultra-filtração, seguido de cromatografia de gel filtração. O autor alcançou um fator de purificação de 125x, porém aproximadamente 93% das moléculas ativas de enzima se perderam durante o processo de purificação.

Palomo et al. (2004a) adsorveram 100% da lipase BTL-2 oferecida (1 mg/g suporte) em gel de agarose-octil a baixa força iônica (5 mM) em um período de 1 hora. Hernández-García et al. (2014) purificou e imobilizou um extrato comercial de lipase A de *Aspergillus niger* utilizando partículas magnéticas ativadas com grupos octil. A lipase foi purificada através de adsorção em pH 7,0 a baixa força iônica (5 mM) utilizando partículas magnéticas comerciais MaKProt C8 e desorvida do suporte com solução de Triton X-100 0,2%. O extrato desorvido do suporte foi purificado em um fator de 66,75 vezes em relação ao extrato comercial inicial.

4.5.1 Variação da massa de suporte SMMp-octil na adsorção de BTL-2

Com o objetivo de melhorar o rendimento de adsorção dos suportes SMMp recobertos com diferentes densidades de grupos octil foi realizado um experimento de adsorção

variando-se a massa de suporte oferecida para a mesma quantidade de solução enzimática oferecida anteriormente. Dessa forma, a proporção de suporte/enzima que anteriormente foi de 1:10 (m/v) passou a ser 2:10 (m/v), dobrando a massa oferecida e também 3:10 m/v, triplicando a massa oferecida para os SMMps-octil 25%, 50% e 100%. Para o SMMp-octil 75% foi realizado ensaio apenas duplicando a massa já que o seu rendimento de adsorção já estava acima de 90%. As demais condições de adsorção permaneceram inalteradas e foram realizadas conforme o item 3.3.11.

Os resultados da adsorção em SMMp-octil 25% encontram-se na Tabela 4.6. Observa-se que ao dobrar a massa de suporte e mantendo a mesma carga de enzima o rendimento de adsorção passou de 51,95% para 71,68%. No entanto, a atividade adsorvida passou de 210,14 U_{TBU}/ml suporte para 119,19 U_{TBU}/ml . O rendimento de adsorção de proteína passou de 28,29% para 45,8% e a atividade específica teoricamente adsorvida no derivado diminuiu de 133,17 U_{TBU}/mg para 89,89 U_{TBU}/mg . Mesmo dobrando a massa de suporte, o aumento de rendimento de adsorção de enzima e de proteína não foi equivalente ao dobro, comportamento semelhante foi observado ao triplicar a massa do suporte. Ao triplicar a massa de suporte para uma mesma carga de enzima o RA_E passou de 51,95% (condição 1:10 m/v) para 80,05 e o RA_P de 28,29% para 43,5%. A atividade específica no derivado diminuiu em relação à condição 1:10 (m/v) que foi de 133,17 U_{TBU}/mg para 105,57 U_{TBU}/mg ao triplicar a massa de suporte.

Tabela 4.6 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 25% nas proporções de 1:10 m/v, 2:10 (m/v) ou 3:10 (m/v); pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

Suporte SMMp-octil 25%	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
1:10 (m/v)	210,14	1,62	51,95	28,29	70,48	133,17
2:10 (m/v)	119,19	1,33	71,68	45,8	57,38	89,89
3:10 (m/v)	88,78	0,84	80,05	43,5	57,38	105,57

Os resultados da adsorção em SMMp-octil 50% encontram-se na Tabela 4.7. É possível observar que ao dobrar a massa de suporte e mantendo a mesma carga de enzima o rendimento de adsorção passou de 54,58% para 71,16%, no entanto a atividade adsorvida passou de 220,98 U_{TBU}/ml suporte para 117,88 U_{TBU}/ml . O rendimento de adsorção de proteína passou de 31,42% para 35,7% e a atividade específica diminuiu de 123,11 U_{TBU}/mg proteína

para 114,34 U_{TBU}/mg . Ao triplicar a massa de suporte para uma mesma carga de enzima o RA_E passou de 54,58% (condição 1:10 m/v) para 80,14 e o RA_P de 31,42% para 32,3%. Interessante observar que para 3:10 m/v a atividade específica no derivado aumentou em relação à condição 1:10 (m/v) que passou de 123,11 U_{TBU}/mg para 142,29 U_{TBU}/mg de proteína.

Tabela 4.7 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 50% nas proporções de 1:10 m/v, 2:10 (m/v) ou 3:10 (m/v); pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

Suporte SMMp-octil 50%	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
1:10 (m/v)	220,98	1,78	54,58	31,42	70,48	123,11
2:10 (m/v)	117,88	1,03	71,16	35,7	57,38	114,34
3:10 (m/v)	88,82	0,62	80,14	32,3	57,38	142,29

Os resultados da adsorção em SMMp-octil 75% encontram-se na Tabela 4.8. É possível observar que ao dobrar a massa de suporte e mantendo a mesma carga de enzima o rendimento de adsorção passou de 92,87% para 97,78%, no entanto a atividade adsorvida passou de 374,33 U_{TBU}/ml suporte para 169,89 U_{TBU}/ml . O rendimento de adsorção de proteína passou de 79,28% para 96,9% e a atividade específica do derivado diminuiu de 82,50 U_{TBU}/mg proteína para 59,91 U_{TBU}/mg . Logo, a alteração da massa do suporte SMMp-octil 75% não melhorou significativamente a adsorção da enzima ao suporte e a atividade específica no derivado, pois também favoreceu a adsorção de outras proteínas. No entanto, o aumento da massa de suporte empregada no procedimento de adsorção permitiu adsorver praticamente 100% da atividade contida em solução.

Tabela 4.8 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 75% nas proporções de 1:10 m/v e 2:10 (m/v); pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

Suporte SMMp-octil 75%	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
1:10 (m/v)	374,33	4,54	92,87	79,28	70,48	82,50
2:10 (m/v)	169,89	2,84	97,78	96,9	59,39	59,91

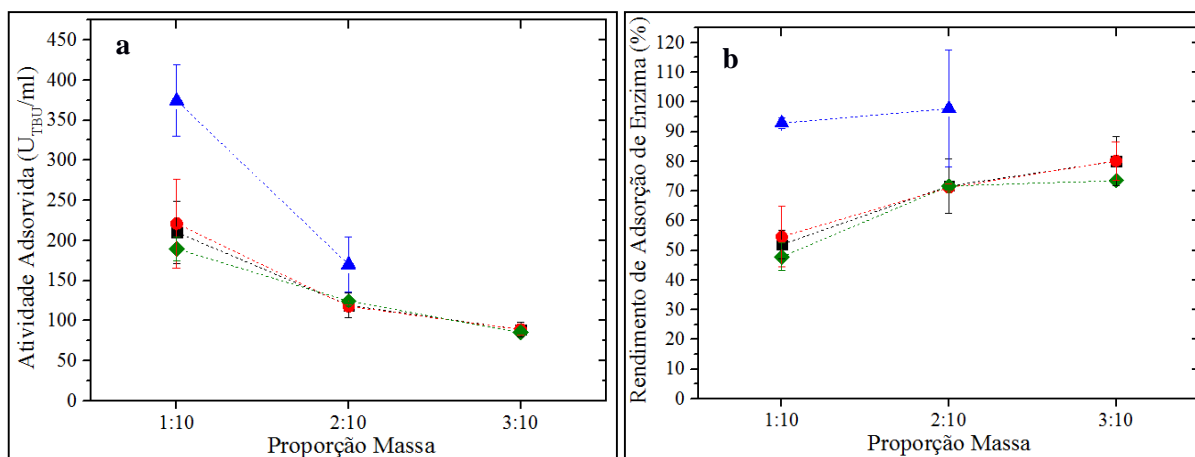
Os resultados da adsorção em SMMp-octil 100% encontram-se na Tabela 4.9. Ao dobrar a massa de suporte e mantendo a mesma carga de enzima o rendimento de adsorção passou de 47,82% para 71,71%, no entanto a atividade adsorvida passou de 190,39U_{TBU}/ml suporte para 124,40U_{TBU}/ml. O rendimento de adsorção de proteína passou de 38,31% para 52,99% e a atividade específica diminuiu de 90,19U_{TBU}/mg proteína para 80,37 U_{TBU}/mg. Mesmo dobrando a massa de suporte, o aumento de rendimento de adsorção de enzima e de proteína não aumentou significativamente. O mesmo comportamento foi observado ao se triplicar a massa do suporte. Ao triplicar a massa de suporte para uma mesma carga de enzima o RA_E passou de 47,82% (condição 1:10 m/v) para 73,49 e o RA_P de 38,31% para 66,65%. A atividade específica no derivado diminuiu em relação à condição 1:10 (m/v) que foi de 90,19U_{TBU}/mg para 65,48U_{TBU}/mg ao triplicar a massa de suporte.

Tabela 4.9 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 100% nas proporções de 1:10 m/v, 2:10 (m/v) ou 3:10 (m/v); pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. At_{Tea}: atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea}: proteína teórica adsorvida. RA_E: rendimento de adsorção da enzima. RA_P: rendimento de adsorção da proteína. AE₀: atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD}: atividade específica teórica no derivado

Suporte SMMp-octil 100%	At _{Tea} (U _{TBU} /ml suporte)	Pt _{Tea} (mg/ml suporte)	RA _E (%)	RA _P (%)	AE ₀ (U _{TBU} /mg proteína)	AE _{TD} (U _{TBU} /mg proteína)
1:10 (m/v)	189,45	2,38	47,91	43,75	73,13	79,90
2:10 (m/v)	124,40	1,55	71,71	52,99	59,39	80,37
3:10 (m/v)	85,12	1,30	73,49	66,65	59,39	65,48

A Figura 4.11 apresenta o gráfico de atividade adsorvida (a) e o rendimento de adsorção (b) em termos atividade enzimática para as diferentes massas utilizadas na adsorção de BTL-2 em SMMps ativadas com 25, 50, 75 e 100% de grupos octil. Nota-se que todos os suportes apresentaram comportamento semelhante em que tiveram diminuição na atividade adsorvida por grama de massa seca e aumento significativo no rendimento de adsorção de enzima.

Figura 4.11 - Gráfico da atividade adsorvida da Lipase BTL-2 (a) e rendimento de adsorção da enzima (b) em SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% nas proporções de 1:10 m/v, 2:10 (m/v) ou 3:10 (m/v); pH 7,0 (5mM), 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. (■) SMMp-octil 25%; (●) SMMp-octil 50%; (▲) SMMp-octil 75%; (◆) SMMp-octil 100%; m.s.: massa seca



A fim de avaliar de forma mais aprofundada a capacidade de adsorção do suporte SMMp-octil 75% que foi o suporte que obteve RA_E semelhante a agarose, foi feita adsorção dobrando a carga de enzima em relação ao protocolo que vinha sendo utilizado até o momento. No caso dobrou-se a solução enzimática oferecida para a mesma massa de suporte. As demais condições de adsorção foram realizadas conforme o item 3.3.11. Os resultados encontram-se na Tabela 4.10. A adsorção com o dobro de carga de enzima alcançou RA_E de 83,33%, resultado esse inferior ao observado para a adsorção na proporção de 1:10 (m/v) que foi de 92,87%. No entanto, a adsorção por volume de suporte aumentou consideravelmente passando de 374,33 U_{TBU}/ml suporte para 622,60 U_{TBU}/ml de atividade adsorvida e de 4,54 mg/ml suporte para 7,08 mg/ml de proteína adsorvida. A atividade específica no derivado que foi de 82,50 U_{TBU}/mg passou para 87,93 U_{TBU}/mg quando a carga de enzima oferecida foi dobrada, uma variação pouco significativa. Os resultados mostraram que aumentando a carga de enzima para a massa suporte que vinha sendo utilizada é possível alcançar valores ainda mais altos de enzima adsorvida ao suporte, tornando o suporte SMMp-octil 75% ainda mais interessante para a purificação/imobilização da BTL-2.

Os resultados obtidos neste experimento evidenciam o grande potencial de uso das SMMps em processos de purificação de proteínas, pois mesmo o material apresentando inicialmente um desempenho inferior ao alcançado usando agarose-octil, após alteração das condições de adsorção foi possível atingir resultados muito semelhantes para algumas variáveis e até melhores para outras, como foi o caso do SMMp-octil 75% empregado na proporção de 2:10 e 1:20 (g de suporte/mL de solução de adsorção), neste aspecto o resultado mais

interessante foi a adsorção na proporção de 1:20 em que o processo apresentou bons rendimentos de adsorção (83%) com boa seletividade e altíssima carga em termos de atividade lipolítica (622 U_{TBU}/mL). O suporte que apresentou os piores resultados no geral foi o SMMp-octil 100%, este suporte tem características extremamente hidrofóbicas o que provavelmente dificulta a difusividade da solução de imobilização no interior dos poros do material e consequentemente a adsorção de proteínas em sua superfície, devido as características do material bloqueio de poros também pode estar ocorrendo.

Tabela 4.10 - Adsorção da Lipase BTL-2 em SMMp-octil 75% na proporção de 1:20 m/v, pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital à 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

Suporte SMMp-octil 75%	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
1:10 (m/v)	374,33	4,54	92,87	79,28	70,48	82,50
1:20 (m/v)	622,60	7,08	83,33	60,2	63,58	87,93

4.6 Adsorção de BTL-2 em Sílica com Diferentes Densidades de Grupos Octil

Com a intenção de confirmar o bom desempenho dos suportes SMMp e ter um padrão para comparação dos procedimentos de ativação com diferentes densidades de grupos octil, foi selecionada a sílica macroporosa comercial IM S60P (ChiralVision) para fazer o mesmo procedimento de ativação de diferentes densidades de grupos octil conforme o item 3.3.7. A sílica foi selecionada para comparação porque possui algumas características próximas ao SMMp, como por exemplo o recobrimento da superfície de SMMp por sílica. As condições de adsorção foram realizadas conforme o item 3.3.14 e os resultados para adsorção de BTL-2 na sílica em diferentes densidades de grupos octil encontram-se na Tabela 4.11. É possível observar a partir dos dados que para todas as variações de densidade de grupos octil a atividade e a proteína adsorvida por volume de suporte foi superior no suporte SMMp. Assim como ocorrido com o suporte SMMp, a densidade de octil para a sílica que conduziu ao maior RA_E foi 75%, obtendo-se 76,15% (157,11 U_{TBU}/ml) enquanto que para o SMMp-octil 75% o RA_E foi de 92,87% (374,33 U_{TBU}/mL). A condição de menor adsorção de enzima e proteína foi sílica-octil 50% com RA_E de 47,27% (97,64 U_{TBU}/ml), diferente do SMMp que teve sua menor

adsorção com o SMMp-octil 100%. Enquanto que para o SMMp a adsorção mais seletiva foi com 25% de grupos octil (133,17 U_{TBU}/mg) para a sílica a adsorção mais seletiva ocorreu com 50% de grupos octil (320,24 U_{TBU}/mg).

Tabela 4.11 - Adsorção da Lipase BTL-2 em sílica-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

Sílica-octil	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
25%	129,59±4,23	1,13±0,22	62,85±2,69	31,40±7,32	56,91	117,00
50%	97,64±3,13	0,31±0,05	47,27±1,73	8,57±1,88	56,91	320,24
75%	157,11±4,34	2,50±0,10	76,15±1,68	69,10±5,27	56,91	62,89
100%	116,77±16,10	0,98±0,10	54,16±2,43	30,78±2,29	69,71	112,72

4.7 Estudo da Dessorção da BTL-2 de SMMp-octil

Para o estudo da dessorção da enzima do suporte foi utilizado o surfactante Triton X-100. No item 4.4.1 foi realizada dessorção utilizando Triton X-100 na concentração 0,2% (m/v) para dessorver a enzima do suporte SMMp-octil 100%. Contudo, foi possível dessorver apenas 16,58% da enzima adsorvida ao suporte (31,57 U_{TBU}/g ml). Sendo assim, optou-se por estudar a variação da concentração de Triton X-100 em 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5% (m/v) para a dessorção dos suportes SMMp-octil 25%, 50%, 75 e 100% visto que alguns trabalhos atestam a necessidade em variar a concentração do surfactante para dessorver a BTL-2 de diferentes suportes (Fernandez-Lorente et al. 2008). O procedimento de dessorção foi realizado conforme o item 3.3.15.

É possível observar na Figura 4.12 e 4.13 que a concentração de Triton X-100 de 0,4% foi a melhor alternativa para dessorver a maior quantidade de enzima dos suportes SMMp-octil 25%, 75% e 100%, enquanto que a concentração de 0,5% (m/v) foi a melhor concentração para dessorção em SMMp-octil 50%, embora a concentração de 0,4% (m/v) tenha apresentado resultados muito similares.

Figura 4.12 – Gráfico da atividade dessorvida de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25%, 50%, 75% e 100%, variando-se a concentração de Triton X-100 de 0,1% a 0,5% (m/v). Dessorção em pH 7,0 (5 mM), na proporção de 1:10 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-25%; (●) SMMp-octil 50%; (▲) SMMp-octil 75%; (◆) SMMp-octil 100%

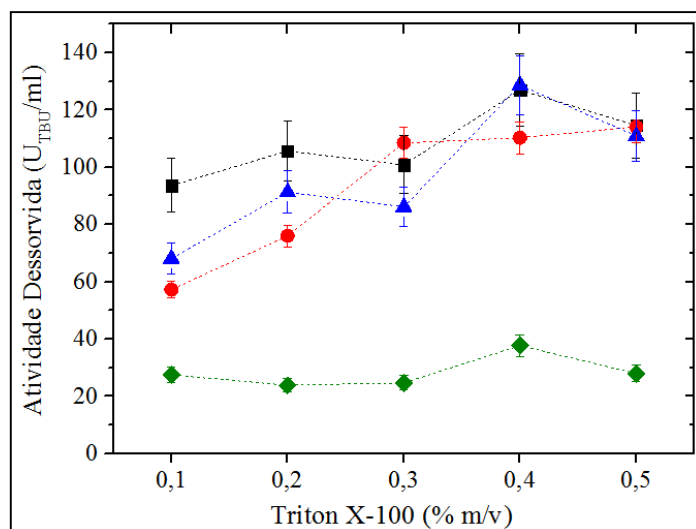
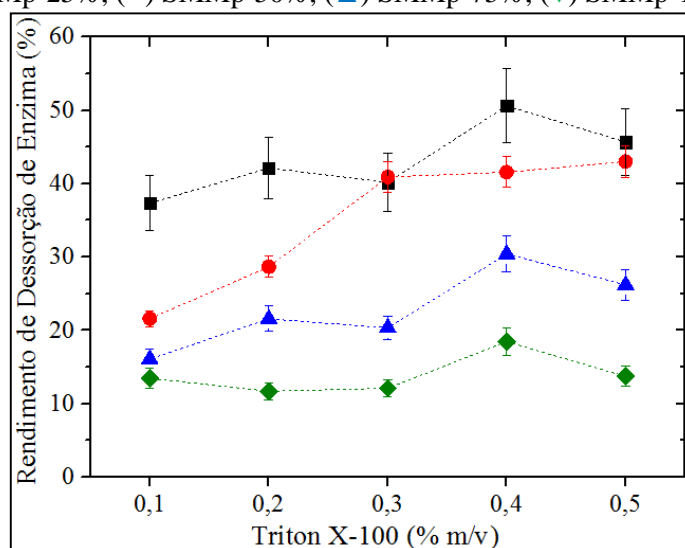


Figura 4.13 - Gráfico do rendimento de dessorção de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25%, 50%, 75% e 100%, variando-se a concentração de Triton X-100 de 0,1% a 0,5% (m/v). Dessorção em pH 7,0 (5mM), na proporção de 1:10 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-25%; (●) SMMp-50%; (▲) SMMp-75%; (◆) SMMp-100%.



A Tabela 4.12 apresenta as condições que resultaram na maior eficiência de dessorção para os diferentes suportes magnéticos e todas as principais variáveis resultantes desses experimentos. O SMMp-octil 25% apresentou maior rendimento de dessorção, 50,60%, enquanto o SMMp-octil 100% teve o menor rendimento de dessorção de enzima, 18,46%. A alta hidrofobicidade de SMMp-octil 100% pode dificultar a dessorção da enzima do suporte uma vez que quanto maior o número de interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte mais difícil será a dessorção para uma determinada condição. No caso do SMMp-ctil 100%, a alta

hidrofobicidade do material pode ainda ter dificultado a difusão da solução de dessorção contendo Triton X-100 no interior dos poros do material dificultando, conseqüentemente, a quebra da interação hidrofóbica entre a enzima e o suporte. Por outro lado, no suporte SMMp-octil 25%, com menor hidrofobicidade, foi possível a dessorção de maior quantidade de enzima.

Tabela 4.12 - Dados das maiores atividades de dessorção da Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. RDE: rendimento de dessorção de enzima. RDP: rendimento de dessorção de proteína. FP: Fator de purificação

Suporte SMMp-octil	Triton X-100 (% m/v)	Atividade Dessorvida (U _{TBU} /ml suporte)	Proteína Dessorvida (mg/ml suporte)	RDE (%)	RDP (%)	FP
25%	0,4	126,94	1,17	50,60	81,35	1,42
50%	0,5	114,10	1,03	43,01	51,95	1,45
75%	0,4	128,67	1,15	30,39	24,77	1,46
100%	0,4	37,69	0,09	18,46	3,22	5,78

É importante ressaltar também que o rendimento de dessorção está relacionado com a quantidade de enzima adsorvida para cada suporte, e cada um deles teve rendimento de adsorção diferente. O SMMp-octil 75% obteve maior atividade dessorvida de 128,67 U_{TBU}/ml de suporte, seguido pelo SMMp-octil 25% com 126,94 U_{TBU}/ml de suporte dessorvidas

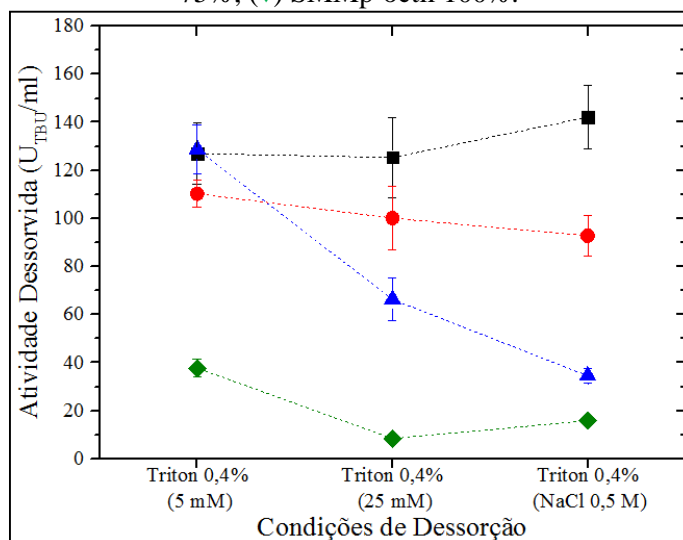
A dificuldade de total dessorção da BTL-2 de suportes magnéticos ativados com densidades menores de grupos octil, como o SMMp-octil 25%, sob ação de concentrações relativamente elevadas de Triton X-100 indica que a interação pode não estar sendo apenas hidrofóbica, conforme já indicado pela adsorção de proteína em SMMp sem grupos octil. Apesar da dificuldade para dessorção do suporte hidrofóbico SMMp-octil 100%, ele apresentou maior fator de purificação de 5,78 vezes enquanto os outros suportes apresentaram um fator de aproximadamente 1,4x. Esse comportamento já havia sido identificado no item 4.4.1 quando foi empregado 0,2% (m/v) de Triton X-100 para dessorver a enzima de SMMp-octil 100%.

Com a possibilidade de estar ocorrendo outras interações na adsorção que não somente a hidrofóbica decidiu-se aumentar a força iônica da solução de dessorção a fim de desfazer também possíveis interações iônicas, mas ainda mantendo o Triton X-100 na concentração que gerou melhores resultados de dessorção para a maioria dos suportes que foi a 0,4% (m/v). Dessa forma, foi testada uma solução de Triton X-100 0,4% (m/v) preparada em tampão fosfato pH 7,0 (25 mM) e também solução de Triton X-100 0,4% (m/v) preparada em

tampão fosfato pH 7,0 (25 mM) contendo NaCl 0,5M conforme procedimento descrito no item 3.3.15.

É possível notar a partir da Figura 4.14 que o único suporte que apresentou aumento significativo na atividade desorvida foi o SMMp-octil 25% que na solução de Triton X-100 0,4% (m/v) e força iônica 5 mM havia desorvido 126,94 U_{TBU}/ml suporte em solução com força iônica 25 mM acrescido de NaCl 0,5 M desorveu 142,12 U_{TBU}/ml (RD_E 73,20%). Sustentando ainda mais a hipótese de interação iônica, principalmente para o suporte menos hidrofóbico, o SMMp-octil 25%.

Figura 4.14 - Gráfico de atividade desorvida da Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 0,4% (m/v) com força iônica de 5 mM, 25 mM ou 25 mM acrescido de NaCl 0,5M, na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25°C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-octil 25%; (●) SMMp-octil 50%; (▲) SMMp-octil 75%; (◆) SMMp-octil 100%.

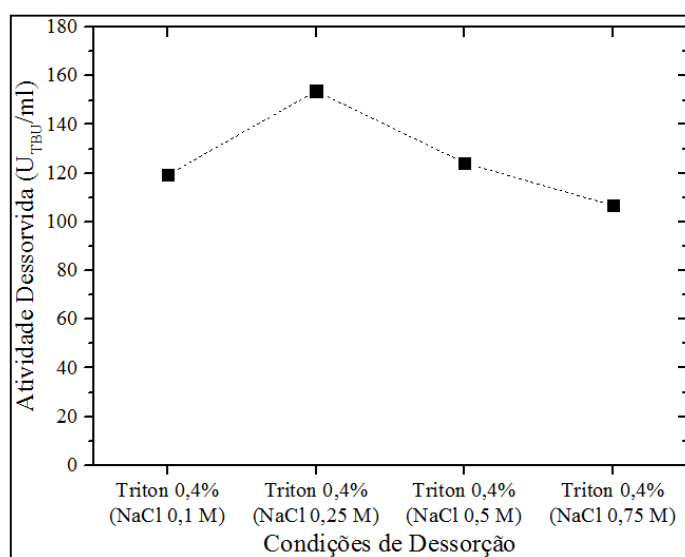


Sendo assim, decidiu-se testar a variação da força iônica na dessorção do suporte SMMp-octil 25% variando a concentração de NaCl em 0,1; 0,25; 0,5 e 0,75 M na solução de Triton X-100 0,4% (m/v) em tampão pH 7,0 (25 mM). O procedimento de dessorção foi feito conforme o item 3.3.15 e os resultados encontram-se na Figura 4.15.

Conforme observado na Figura 4.15, a solução de dessorção contendo NaCl 0,25 M permitiu dessorção de maior atividade de enzima do suporte SMMp-octil 25% de 153,78 U_{TBU}/ml equivalente a um RD_E de 74,35% e fator de purificação de 1,88 vezes. O fato de aumentar a força iônica favorece a dessorção em caso de interação iônica, mas também favorece a adsorção de proteína em caso de interação hidrofóbica, por isso pode ter ocorrido a diminuição da dessorção em força iônica muito alta como em 0,75 M de NaCl, sendo importante então encontrar a força iônica que represente o melhor equilíbrio para maior dessorção de enzima.

Com base no conjunto de resultados dos experimentos de adsorção e principalmente de dessorção da BTL-2 de suportes ativados com diferentes densidades de grupos octil e em diferentes condições é possível inferir que interações hidrofóbicas e de troca catiônica estão ocorrendo simultaneamente nos diferentes derivados.

Figura 4.15 - Gráfico de atividade dessorvida da Lipase BTL-2 do suporte SMMp-octil 25% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 0,4% (m/v) com tampão fosfato pH 7,0 (25 mM+ NaCl 0,1; 0,25; 0,5 ou 0,75 M, na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25°C por 1h e 30 minutos.



Como discutido anteriormente, o suporte SMMp apresenta carga negativa devido aos grupos silanóis presentes na superfície do material e a BTL-2 pode se adsorver neste material devido à alta densidade de grupos carregados positivamente em sua estrutura e também a solubilidade reduzida da enzima em pH 7,0 (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009). As SMMps foram preparadas em condições reacionais que propiciam a presença de grupos silanol Q₃ na superfície do material, que são carregados negativamente em pH 7,0 (ILLER, 1979). Esses grupos silanóis permitiram a adsorção da lipase em SMMps sem a necessidade de qualquer método de ativação adicional. O recobrimento total de SMMps com grupos octil (100%) tende a diminuir consideravelmente o número de grupos silanóis negativamente carregados na superfície do material. Porém, quanto menor a densidade de grupos octil na superfície das SMMps, maior será a densidade de grupos silanóis negativamente carregados. Logo, SMMp-octil 75, 50 e 25% possuem uma quantidade considerável e crescente de grupos negativamente carregados na superfície do material. Desta forma, para todos os suportes testados existe uma interação mista hidrofóbica-iônica que explica o fato de ser tão difícil dessorver a enzima da superfície de SMMps e até mesmo a relativamente baixa seletividade hidrofóbica observada.

Como a interação é mista, o número de proteínas capaz de se adsorver a superfície do suporte é maior. Neste caso, a adsorção de proteínas nesse suporte em valores de força iônica mais elevados, como 25-100 mM, pode facilitar a adsorção seletiva hidrofóbica, pois diminui a capacidade de interação iônica, tanto do material quanto da proteína. Da mesma forma, a dessorção na presença de Triton acrescido de NaCl ou em valores de força iônica mais elevados são necessários para romper, de forma simultânea, interações hidrofóbicas e iônicas. Infelizmente, quanto maior a força iônica do meio, maior também será a tendência para interações hidrofóbicas já que a presença de sais diminui a solubilidade de proteínas, o que favorece interações hidrofóbicas (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005). Logo tanto a adsorção, quanto a dessorção de proteínas de suportes SMMp-octil ativados com diferentes densidades de grupos octil pode ser uma tarefa complexa.

4.8 Estudo da Dessorção da BTL-2 de Sílica-octil

A sílica ativada com diferentes densidades de grupos octil contendo BTL-2 em sua superfície também foi avaliada em experimentos de dessorção para comparação com os resultados obtidos empregando SMMps. Para esses experimentos, foram selecionadas as melhores condições de dessorção observadas para os diferentes suportes SMMp-octil, que foram Triton X-100 0,4% (m/v) em tampão pH 7,0 (5 mM), Triton X-100 0,4% (m/v) em tampão pH 7,0 (25 mM) acrescido de NaCl 0,5 M e também a condição geralmente empregada na literatura para dessorção de BTL-2 de suportes hidrofóbicos de 0,2% (m/v) de Triton X-100 em pH 7,0 (5 mM). Os procedimentos de dessorção foram realizados conforme o item 3.3.15.

É possível notar a partir da Figura 4.16 que a concentração de Triton X-100 de 0,4% (m/v) dessorveu maior quantidade de enzima dos suportes Sílica-octil 50%, 75% e que a concentração 0,2% (m/v) foi a melhor concentração para dessorção em Sílica-octil 25% e 100%. A Tabela 4.13 apresenta as condições que resultaram em maiores rendimentos de dessorção em termos de atividade lipolítica para os diferentes suportes de sílica-octil.

Figura 4.16 - Gráfico de atividade dessorvida da Lipase BTL-2 dos suportes sílica-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 0,2% (m/v) pH 7,0 (5mM), Triton X-100 0,4% (m/v) pH 7,0 (5mM) ou (25mM + NaCl 0,5M), na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25°C por 1h e 30 minutos. (■) Sílica-octil 25%; (●) Sílica-octil 50%; (▲) Sílica-octil 75%; (◆) Sílica-octil 100%.

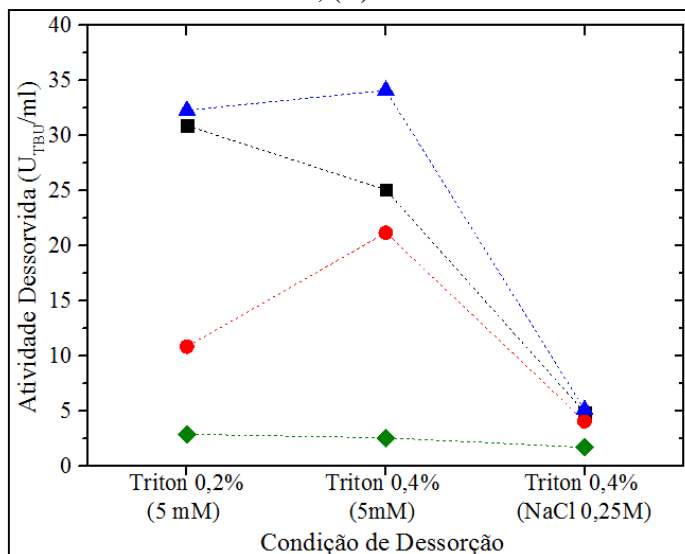


Tabela 4.13 - Dados das maiores atividades de dessorção da Lipase BTL-2 dos suportes sílica-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. RD_E: rendimento de dessorção de enzima. RD_P: rendimento de dessorção de proteína.

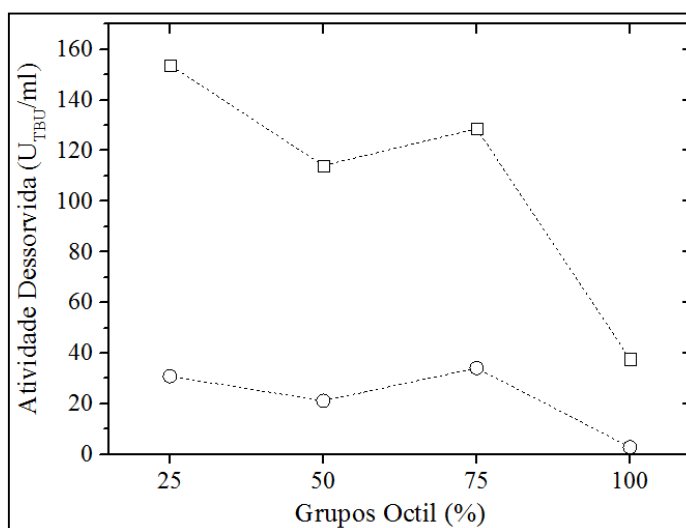
Suporte Sílica-octil	Triton X-100 (% m/v)	Atividade Dessorvida (U _{TBU} /ml suporte)	Proteína Dessorvida (mg/ml suporte)	RD _E (%)	RD _P (%)	FP
25%	0,2*	30,90	0,49	24,77	53,48	1,14
50%	0,4*	21,17	0,34	21,01	91,96	1,04
75%	0,4*	34,12	0,65	21,13	27,38	1,25
100%	0,2*	2,88	0,18	2,61	16,83	0,28

* solução preparada em tampão fosfato pH 7,0 (5mM) sem acréscimo de NaCl.

A partir dos dados da Figura 4.17, nota-se que, para todas as variações de densidade de grupos octil, a atividade dessorvida por volume de suporte foi superior para os suportes SMMp em relação à sílica. Assim como no SMMp, a densidade de octil que permitiu maior RD_E foi a sílica-octil 25%, 24,77% (30,90U_{TBU}/ml) usando Triton X-100 0,4%, enquanto que para o SMMp-octil 25% o RD_E foi de 74,35% (153,78 U_{TBU}/g ml) alcançado usando solução de Triton X-100 0,4% acrescido de NaCl 0,25 M. A condição de menor RD_E foi sílica-octil 100% com RD_E de 2,61% (2,88 U_{TBU}/ml), assim como aconteceu para o SMMp-octil que teve seu menor RD_E com o SMMp-octil 100%, 18,46% (37,69 U_{TBU}/ml). Assim como para o

SMMp-octil 100%, a alta hidrofobicidade da sílica-octil dificulta a dessorção da enzima do suporte seja pela intensidade da interação hidrofóbica ou pela dificuldade de difusão da solução de dessorção no interior dos poros do material. Enquanto que para o SMMp a adsorção mais seletiva foi com 25% de grupos octil (133,17 U_{TBU}/mg), para a sílica a adsorção mais seletiva ocorreu com 50% de grupos octil sendo 320,24 U_{TBU}/mg . O maior fator de purificação alcançado na dessorção foi para a sílica-octil 75%, com fator de purificação de 1,25 vezes, diferentemente de SMMp-octil que obteve maior fator de purificação com o SMMp-octil 100% de 5,78 vezes. De um modo geral a sílica-octil apresentou baixos fatores de purificação indicando que a dessorção não foi seletiva. Na comparação geral, os SMMps parecem ter sido mais eficientes na dessorção da molécula alvo.

Figura 4.17 - Gráfico de atividade dessorvida da Lipase BTL-2 alcançadas nas melhores condições de dessorção dos suportes sílica-octil e SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando solução de dessorção contendo Triton X-100 conforme Tabelas 4.12 e 4.13, na proporção de 1:5 m/v sob agitação em shaker orbital a 50 rpm, 25°C por 1h e 30 minutos. (□) SMMp-octil; (○) Sílica-octil.



Apesar da sílica-octil 25% ter obtido maior RD_E , a sílica-octil 75% obteve maior dessorção em termos de atividade lipolítica de 34,12 U_{TBU}/ml comparado com a sílica-octil 25% que obteve 30,90 U_{TBU}/ml . Como discutido anteriormente, o rendimento de dessorção está relacionado com a quantidade de enzima adsorvida para cada suporte, sendo que cada suporte obteve diferentes rendimentos de adsorção de enzima.

O aumento da força iônica com o acréscimo de NaCl 0,25 M não propiciou aumento da dessorção da enzima da sílica-octil 25%, diferente do SMMp-octil 25% que obteve maior dessorção da enzima quando acrescentado NaCl 25 mM. Apesar do aumento da força iônica favorecer a dessorção em caso de interação iônica, este aumento também favorece a adsorção de proteínas em caso de interação hidrofóbica.

É importante lembrar que a sílica, assim como o SMMp, apresentou adsorção da enzima mesmo sem recobrimento com grupos octil (RA_E 60,93% conforme item 4.4). Mesmo que o acréscimo de NaCl não tenha aumentado a dessorção, isso não descarta o fato da sílica apresentar interação mista hidrofóbica-iônica pois os dois materiais, SMMp e sílica, passaram pelo mesmo procedimento de recobrimento por grupos octil cujas condições reacionais propiciam a presença de grupos silanóis Q_3 na superfície do material a medida que a densidade de grupos octil diminui.

Outro fato a se considerar é que a sílica apresentou comportamento de adsorção diferente do SMMp em relação às diferentes densidades de grupo octil conforme item 4.6, onde foi levantada a hipótese de que o recobrimento da sílica nos diferentes graus de octil não seguiu a proporção efetiva conforme se esperava. Como dito anteriormente, apesar da química de superfície da sílica e dos SMMps ser a mesma, a estrutura morfológica do material pode influenciar consideravelmente as características finais do adsorvente e na força de adsorção da enzima ao suporte. A ativação com organosilanos depende não somente das condições reacionais empregadas (que foram as mesmas para os dois materiais), mas também de características como tamanho de partícula, área de superfície do material, diâmetro de poros, morfologia de poros, interconectividade de poros, densidade e distribuição de grupos silanóis e reatividade destes grupos (BRINKER; SCHERER, 1990).

4.9 Purificação de BTL-2 em uma única etapa

Todos os experimentos realizados anteriormente tiveram como objetivo central testar as diferentes partículas magnéticas SMMps na purificação da lipase BTL-2, bem como outros suportes como a sílica e agarose que foram usados para comparação. Visando facilitar o entendimento relacionado ao uso das SMMps, foi utilizada inicialmente uma solução de BTL-2 já livre de fragmentos celulares (debris) e dialisada para retirar possíveis interferentes como carboidratos, polímeros, DNA e RNA, aminoácidos e polipeptídios, metabólitos microbianos, dentre outros. O processo de diálise empregado também retirou o tampão que mantinha o pH da solução de BTL-2 durante o rompimento celular, permitindo controlar de forma precisa o pH e força iônica do meio contendo BTL-2 e assim testar diferentes estratégias de adsorção e diferentes variáveis. No entanto, uma das principais vantagens de adsorventes magnéticos em relação a adsorventes comuns é a sua resposta a campos magnéticos externos na presença de outros sólidos em suspensão. E essa propriedade faz com que os adsorventes magnéticos possam ser recuperados a partir do meio

reacional, de forma seletiva, mesmo na presença de outros sólidos, o que seria impossível por métodos clássicos de separação (KOPP, 2013).

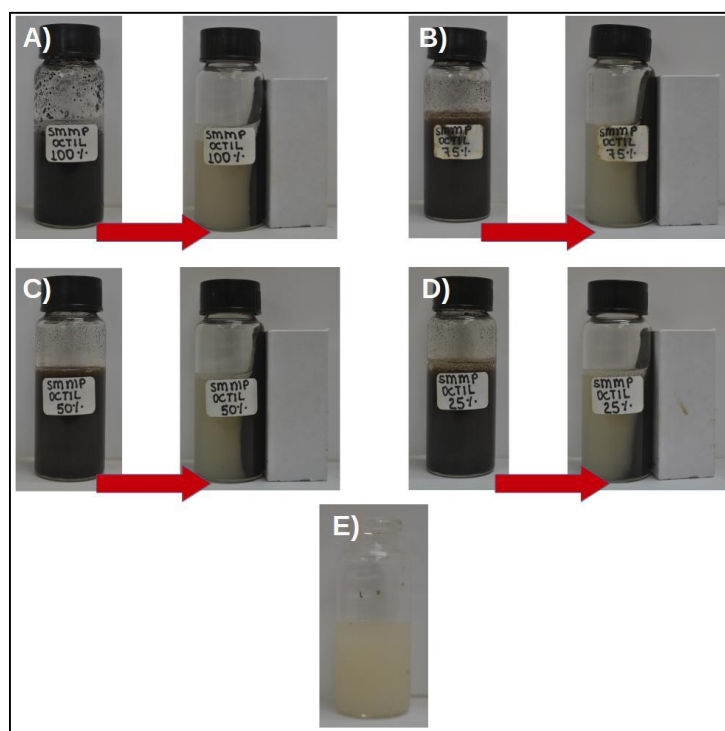
Nesse contexto, com o intuito de testar as SMMps na adsorção de BTL-2 em uma única etapa, utilizou-se o suporte SMMps-octil para a purificação da BTL-2 a partir da suspensão com debris celulares oriunda diretamente do processo de rompimento celular. Dessa forma, foram eliminadas do processo as etapas de centrifugação e diálise que eram feitas após o rompimento celular. A purificação foi efetuada inserindo as partículas magnéticas diretamente na suspensão celular (Figura 4.18). O procedimento foi realizado com SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% e encontra-se descrito no item 3.3.17, com base nos experimentos anteriores e tendo-se em conta a maior concentração de BTL-2 e outras proteínas em solução optou-se por empregar a relação suporte solução enzimática de 2:10 (m/v).

A Figura 4.18 mostra imagens dos procedimentos de adsorção e separação magnética na suspensão celular usando as SMMps contendo diferentes densidades de grupos octil. A aparência turva da solução de suspensão celular indica a presença de alta concentração de debris celulares. A intenção foi adsorver a maior quantidade possível de lipase BTL-2 de forma seletiva, permitindo a purificação de média resolução e concentração da enzima eliminando as etapas de centrifugação, diálise e concentração. Como pode ser observado na Figura 4.18, a separação magnética empregando um magneto de neodímio-ferro-boro foi extremamente eficiente para todos os adsorventes testados, a maior parte do adsorvente foi separada em questão de segundos quando na presença do campo magnético. Após a adsorção, a solução permaneceu turva indicando alta concentração de sólidos em suspensão.

Observa-se a partir da Tabela 4.14 que a adsorção nos diferentes suportes SMMp-octil na presença de debris apresentou a mesma tendência já observada para a adsorção de BTL-2 em SMMps contendo diferentes densidades de grupos octil. O SMMp-octil 75% apresentou maior RA_E (71,25%) e atividade adsorvida de 294,68 U_{TBU}/ml suporte, além do maior rendimento de adsorção de proteínas 91,27%. A adsorção na presença de debris celulares teve menor RA_E quando comparado ao experimento de adsorção com enzima dialisada na mesma proporção 2:10 (m/v) (conforme item 4.5.1, Tabela 4.8) que alcançou RA_E de 97,78% e obteve resultado superior em termos de atividade lipolítica adsorvida que no caso da adsorção empregando enzima dialisada foi de 169,89 U_{TBU}/ml . O menor RA_E na adsorção na presença debris pode ser explicado pela presença de muitos contaminantes na suspensão de células que podem se adsorver à superfície do suporte diminuindo o RA_E . Em contrapartida, neste experimento, a suspensão contendo o lisado celular apresenta maior concentração de enzima

disponível para adsorção já que a solução enzimática não sofreu diluição, nem durante a diálise e nem a adição de tampão para correção do pH e força iônica.

Figura 4.18 - Imagens do procedimento de adsorção da BTL-2 da solução após rompimento celular contendo debris celulares. Neste experimento foi usado SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 2:10 m/v, 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm e a posterior separação do suporte aplicando-se campo magnético externo. a) SMMp-octil 100%. b) SMMp-octil 75%. c) SMMp-octil 50%. d) SMMp-octil 25%. e) Solução controle da suspensão de células sem suporte.



O SMMp-octil 100% apresentou menor RA_E (28,13%) e menor atividade adsorvida de 116,32 U_{TBU}/ml suporte dentre os suportes testados para adsorção direta na presença de debris celulares. Tanto o RA_E quanto a atividade adsorvida foram inferiores à adsorção com enzima dialisada realizada nas mesmas condições que apresentou RA_E de 52,99% e atividade adsorvida e 124,40 U_{TBU}/ml . Assim como aconteceu no item 4.5 a adsorção de enzima aumentou conforme o aumento da densidade de grupos octil na superfície do suporte até um máximo de 75%, ao atingir a ativação máxima de 100% de grupos octil a adsorção caiu, provavelmente devido à alta hidrofobicidade do suporte o que dificulta a difusão da solução aquosa contendo a enzima imobilizada no interior dos poros do material, como já discutido anteriormente. O suporte SMMp-octil 50% obteve o segundo melhor RA_E de 41,25% (170,61 U_{TBU}/ml), seu RA_E foi inferior ao experimento de adsorção com enzima dialisada (RA_E 71,16%) mas superior quanto a atividade lipolítica adsorvida que para adsorção com enzima dialisada 117,88 U_{TBU}/ml . O suporte SMMp-octil 25% obteve RA_E de 30,63% (126,66 U_{TBU}/ml), tanto

seu RA_E quanto a atividade lipolítica adsorvida foram inferiores ao experimento de adsorção com enzima dialisada que obteve RA_E de 71,68% e atividade adsorvida de 119,19 U_{TBU}/ml .

De uma maneira geral, os suportes não apresentaram seletividade na adsorção da BTL-2 uma vez que nenhum deles resultou em aumento de atividade específica no derivado em relação à solução inicial. O suporte SMMp-octil 50% mostrou ser o mais seletivo dentre os suportes, mas ainda apresentando atividade específica no derivado inferior à inicial 80,01 U_{TBU}/mg de proteína.

Tabela 4.14 - Dados de adsorção da BTL-2 da solução após rompimento celular contendo debris celulares em suspensão usando SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% na proporção de 2:10 m/v, 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P : rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

SMMp-octil	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
25%	126,66	1,86	30,63	36,44	80,90	68,00
50%	170,61	2,13	41,25	41,71	80,90	80,01
75%	294,68	4,67	71,25	91,27	80,90	63,15
100%	116,32	2,43	28,13	47,56	80,90	47,84

É importante destacar que a adsorção neste experimento foi realizada nas melhores condições do experimento de rompimento celular, que foi efetuado em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0. A alteração no pH e, principalmente, a alteração na força iônica em que foi realizado o experimento (20x maior que nos experimentos anteriores) altera significativamente o processo de adsorção. Nas condições empregadas neste experimento, devido ao aumento na força iônica, a tendência é que até mesmo proteínas pouco hidrofóbicas adsorvam na superfície do material, pois força iônica elevada favorece interações hidrofóbicas (AMERSHAM, 2001). No caso da BTL-2, o aumento da força iônica pode ainda favorecer a adsorção da enzima em múltiplas camadas devido à alta densidade de resíduos hidrofóbicos na sua estrutura (Figura 4.8). A alta força iônica pode ainda reduzir os efeitos das cargas negativas do silanol em SMMps ativadas com OCTEO, pois a alta concentração de sais evita a troca catiônica entre o suporte e a enzima. Desta forma, esse conjunto de fatores fez que a concentração, tanto de BTL-2 quanto de outras proteínas adsorvidas aos suportes aumentasse em relação ao experimento realizado com enzima dialisada na proporção de 2:10 (massa de suporte:mL de solução enzimática), para todos os suportes testados. No entanto, como a

concentração de proteínas e de BTL-2 em solução foi maior que no experimento com solução dialisada o RA_E e RA_P foi menor em todos os casos. Além dos fatores destacados outras substâncias presentes na suspensão contendo debris celulares como carboidratos, DNA e RNA, aminoácidos e polipeptídios, ácidos graxos, sais e metabolitos podem interferir significativamente no processo de adsorção gerando resultados imprevisíveis.

A adsorção da BTL-2 na presença de debris celulares gerou bons resultados mostrando que todos os suportes SMMps testados podem ser empregados na separação de proteínas de interesse na presença de outros sólidos em suspensão de forma eficiente, reduzindo assim o número de etapas do processo de purificação do bioproduto.

4.9.1 Dessorção da Lipase BTL-2

Para a dessorção da lipase do derivado obtido a partir do experimento de adsorção na presença de debris celulares foram realizadas duas etapas: primeiro foi feita a lavagem com água destilada para a dessorção das proteínas contaminantes menos hidrofóbicas e os debris que foram arrastados pelo suporte quando aplicado o campo magnético externo, posteriormente foi realizada a dessorção com Triton X-100. Para a dessorção, foram usadas as condições que apresentaram melhores resultados nos estudos anteriores, as condições usadas foram para o SMMp-octil 25 e 50% solução Triton X-100 0,4% (m/v) contendo NaCl 0,25 M e para o SMMp-octil 75 e 100% solução de Triton X-100 0,4% (m/v) apenas. O procedimento foi realizado conforme o item 3.3.17. Os resultados encontram-se na Tabela 4.15.

É possível notar a partir da Tabela 4.15 que o suporte SMMp-octil 25% obteve maior RD_E de 108% (136,79 U_{TBU}/ml), seguindo a mesma tendência de dessorção da enzima dialisada que também obteve maior dessorção do SMMp-octil 25%, RD_E 50,6% e atividade dessorvida 126,94 U_{TBU}/ml (item 4.7). O segundo melhor RD_E foi observado para o suporte SMMp-octil 50% (84,64%) e atividade dessorvida de 144,39 U_{TBU}/ml , mesmo comportamento da dessorção da enzima dialisada que apresentou para esse suporte RD_E de 43,01% e atividade dessorvida de 114,10 U_{TBU}/ml . O SMMp-octil 75% teve o menor RD_E dentre os suportes, 21,33% (46,86 U_{TBU}/ml), diferente do comportamento da dessorção da enzima dialisada que obteve seu menor RD_E do suporte SMMp-octil 100% de 18,46% e atividade dessorvida de 37,69 U_{TBU}/ml . SMMp-octil 100% também obteve baixo RD_E de 38,87% com atividade dessorvida próxima ao SMMp-octil 75% com dessorção de 45,21 U_{TBU}/ml .

Nota-se que a dessorção da lipase adsorvida em uma única etapa apresentou melhores resultados que a dessorção da enzima dialisada. É importante lembrar que esses dois experimentos apresentaram condições de adsorção diferentes. Para a adsorção direta da lipase foi utilizada maior proporção de suporte em relação à enzima, 2:10 m/v, pH 8,0, alta força iônica (100 mM) e a presença de contaminantes vindos da suspensão de debris celulares. Como já dito anteriormente, esses fatores influenciam de forma significativa o processo de adsorção da enzima bem como a interação entre a enzima e o suporte fazendo com que o procedimento de dessorção apresente um padrão diferente do observado para a dessorção da enzima dialisada.

Esses resultados seguem o comportamento já observado nesse trabalho em experimentos anteriores de que o aumento da hidrofobicidade do material ocasionada pelo aumento na densidade de grupos octil dificulta a dessorção da enzima do material devido à forte interação entre a enzima e o suporte ou por efeitos difusivos que evitam a penetração do Triton X-100 nos poros do material, esse efeito é mais acentuado para o SMMp-octil 100% que é extremamente hidrofóbico. O valor de RD_E maior que 100% pode ter ocorrido devido a presença de Triton X-100 que pode desfazer agregados da enzima aumentando a atividade enzimática (RÚA et al., 1997).

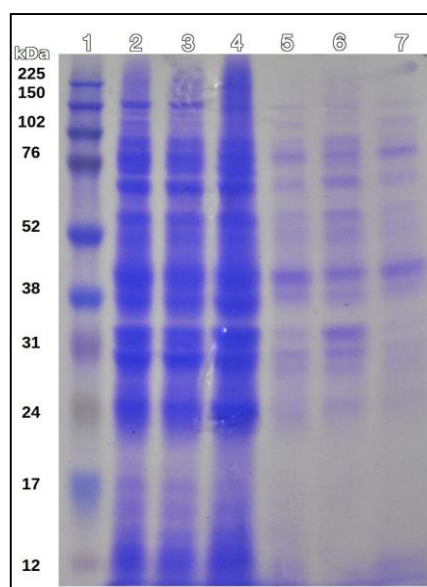
Tabela 4.15 - Dados da dessorção da Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% utilizando Triton X-100 0,4 % (m/v) (SMMp-octil 75 e 100%) e mesma solução com NaCl 0.25M (SMMp-octil 25 e 50%), na proporção de 2:10 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. RD_E : rendimento de dessorção de enzima. RD_P : rendimento de dessorção de proteína.

SMMp-octil	Atividade Dessorvida (U _{TBU} /ml suporte)	Proteína Dessorvida (mg/ml suporte)	RD_E (%)	RD_P (%)	FP
25%	136,79	0,91	108,00	48,78	1,86
50%	144,39	0,89	84,64	41,68	2,01
75%	46,86	1,56	21,33	33,45	0,37
100%	45,21	0,59	38,87	24,32	0,95

A Figura 4.19 mostra o resultado da análise de eletroforese SDS-PAGE para as amostras do experimento de adsorção e dessorção em SMMp-octil 25% na presença de debris celulares. A adsorção possibilitou a retirada de algumas proteínas da solução inicial (2) que foram adsorvidas ao suporte (5). O procedimento de lavagem possibilitou a retirada de uma

grande concentração de proteínas do suporte e também debris celulares que podem ter sido arrastados pelo suporte (4) quando foi aplicado campo magnético externo. Após a lavagem é possível notar a presença de proteínas de diferentes tamanhos adsorvidas ao suporte e é possível observar a presença de uma intensa banda pouco acima de 38 kDa que provavelmente trata-se da enzima alvo, BTL-2 que possui 43 kDa (CARRASCO-LÓPEZ et al, 2009). Após a dessorção é possível observar que ainda ficaram algumas proteínas adsorvidas ao suporte (7) e muitas proteínas foram dessorvidas para a solução de dessorção (6) indicando que este processo não foi seletivo, em ambos é possível distinguir uma banda forte acima de 38 kDa que pode ser assinalada a BTL-2. Apesar dos resultados de dessorção terem indicado que toda a atividade adsorvida ao suporte SMMp-octil 25% foi dessorvida, a eletroforese do suporte indica que algumas proteínas ainda se encontram associadas ao suporte. O rendimento de dessorção aparente de 100% pode, neste caso, ser resultado da alteração do aumento da atividade enzimática por efeito do Triton X-100 (RÚA et al., 1997).

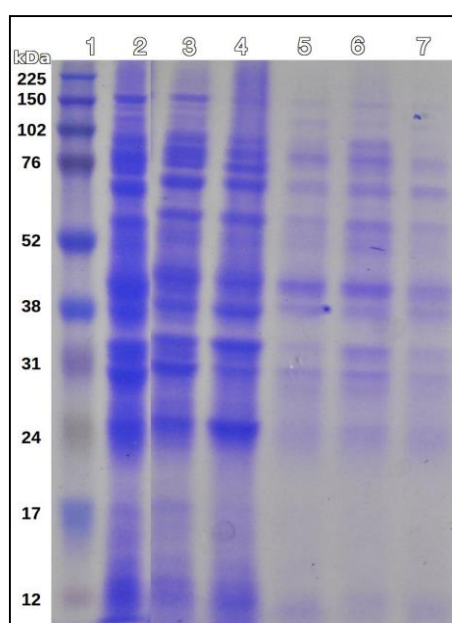
Figura 4.19 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMp-octil 25%. 1- marcador de massa molecular; 2-suspensão inicial (controle); 3-suspensão após adsorção; 4-água de lavagem do suporte; 5-suporte após adsorção e lavagem; 6-sobrenadante após dessorção; 7- suporte após dessorção



A Figura 4.20 mostra o gel de eletroforese feito para as amostras do experimento de adsorção e dessorção em SMMp-octil 50% na presença de debris celulares. A adsorção possibilitou a retirada de algumas proteínas da solução inicial que foram adsorvidas ao suporte (2, 3 e 5). Assim como no experimento anterior, a lavagem foi necessária para retirar proteínas fracamente adsorvidas ao suporte e também parte dos debris celulares arrastados juntamente

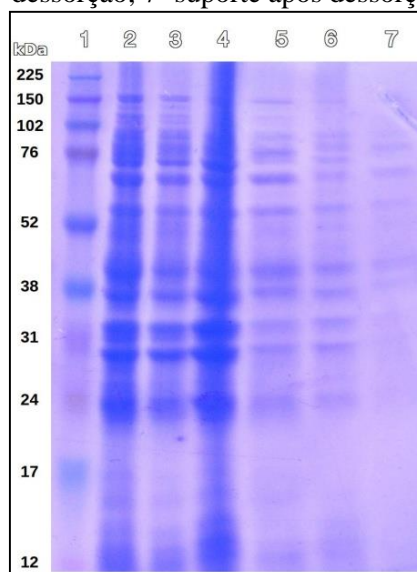
com o suporte (4). Após a lavagem é possível notar a presença de proteínas de diferentes tamanhos adsorvidas ao suporte (5). É possível observar a presença de uma intensa banda característica de BTL-2. Após a dessorção nota-se que ainda ficaram proteínas adsorvidas ao suporte (7), muitas proteínas foram dessorvidas para a solução, porém essa dessorção não foi seletiva, pois praticamente todas as proteínas adsorvidas ao suporte foram dessorvidas em solução.

Figura 4.20 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMp-octil 50%. 1- marcador de massa molecular; 2-suspensão inicial (controle); 3-suspensão após adsorção; 4-água de lavagem do suporte; 5-suporte após adsorção e lavagem; 6-sobrenadante após dessorção; 7- suporte após dessorção



Na Figura 4.21 é possível observar o gel de eletroforese feito para as amostras do experimento de adsorção e dessorção de BTL-2 em SMMp-octil 75% na presença de debris celulares. A adsorção reduziu a concentração de proteínas da solução inicial (2 e 3). A lavagem, mais uma vez, foi usada para retirar proteínas fracamente adsorvidas ao suporte e também debris celulares (4). O suporte após a lavagem possuía ainda muitas proteínas indicando que a adsorção não foi seletiva, mas é possível observar a presença da banda assinalada para BTL-2 (5). Após a dessorção, nota-se que ainda ficaram algumas proteínas adsorvidas ao suporte (7), assim como muitas proteínas que foram dessorvidas para a solução de dessorção (6), estes resultados, novamente, indicam que a dessorção não foi seletiva. A BTL-2 pode ser identificada tanto no suporte quanto na solução de dessorção.

Figura 4.21 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMp-octil 75%. 1- marcador de massa molecular; 2-suspensão inicial (controle); 3-suspensão após adsorção; 4-água de lavagem do suporte; 5-suporte após adsorção e lavagem; 6-sobrenadante após dessorção; 7- suporte após dessorção



A Figura 4.22 mostra o gel de eletroforese feito para as amostras do experimento de adsorção e dessorção em SMMp-octil 100%. Pode-se observar que a amostra da suspensão inicial oferecida para adsorção possui muitas proteínas de vários tamanhos (2). Após a adsorção, a concentração de proteínas no sobrenadante foi reduzida (3). A lavagem mais uma vez foi necessária para retirar debris e proteínas contaminantes (4), o suporte após a lavagem apresenta um conjunto de proteínas onde é possível observar a presença de uma banda pouco acima de 38 kDa que provavelmente trata-se da enzima alvo, a BTL-2 (5). Após a dessorção, nota-se que ainda ficaram proteínas adsorvidas ao suporte (7), todas as proteínas adsorvidas ao suporte foram dessorvidas em solução (6), incluindo a BTL-2.

A Figura 4.23 mostra o gel de eletroforese feito para as amostras do experimento de dessorção em SMMp-octil 25 e 50% na presença de debris celulares. É possível observar 14 bandas de proteínas presentes na amostra em concentração significativa, a banda de 42 kDa da BTL-2 pode ser facilmente visualizada neste gel de eletroforese, a largura e definição da banda indicam alta concentração da proteína. Através deste experimento fica ainda mais fácil visualizar que tanto a adsorção quanto a dessorção da BTL-2 em ambos os suportes não foi seletiva, tendo outras proteínas que se uniram ao suporte. Também é possível visualizar que mesmo após a dessorção ainda existe uma quantidade significativa de BTL-2 e contaminantes adsorvidos ao suporte.

Figura 4.22- Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMp-octil 100%. 1- marcador de massa molecular; 2-suspensão inicial (controle); 3-suspensão após adsorção; 4-água de lavagem do suporte; 5-suporte após adsorção e lavagem; 6-sobrenadante após dessorção; 7- suporte após dessorção

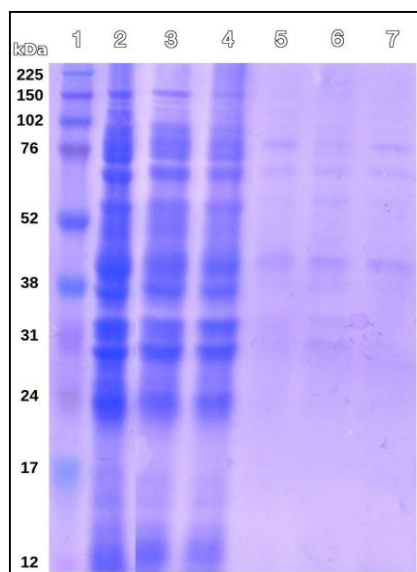
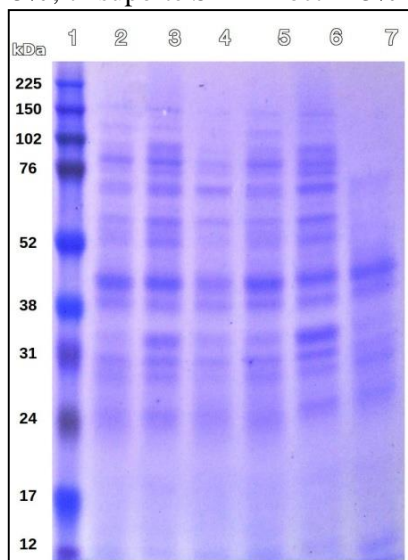


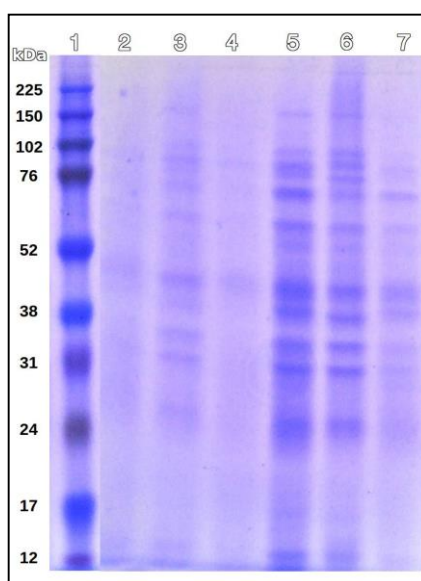
Figura 4.23 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMp-octil 25e 50%. 1- marcador de massa molecular; 2- água de lavagem do suporte SMMP-octil 50%; 3- sobrenadante após dessorção do SMMP-octil 50%; 4- suporte SMMP-octil 50% após dessorção; 5- água de lavagem do suporte SMMP-octil 25%; 6- sobrenadante após dessorção do SMMP-octil 25%; 7- suporte SMMP-octil 25% após dessorção



A Figura 4.24 mostra o gel de eletroforese feito para as amostras do experimento de dessorção em SMMp-octil 75 e 100% na presença de debris. Confirmando os resultados de adsorção, é possível verificar que existe pouca proteína adsorvida ao suporte SMMp-octil 100%, pois foi possível dessorver deste suporte, de forma não seletiva, várias proteínas incluindo a BTL-2. É possível observar que o suporte SMMp-octil 75% adsorveu muito mais

proteínas e também houve uma dessorção mais significativa quando comparado ao SMMP-octil 100%. Poucas proteínas ficaram adsorvidas ao suporte após o procedimento de dessorção. No derivado e na solução de dessorção de SMMP-octil 75%, é possível distinguir muito bem uma banda pouco acima de 38 kDa (BTL-2). Vale a pena ressaltar que o suporte SMMP-Octil 75% foi o que apresentou melhor desempenho considerando-se todas os parâmetros.

Figura 4.24 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção de BTL-2 na presença de debris celulares em SMMP-octil 75e 100%. 1- marcador de massa molecular; 2- suporte SMMP-octil 100% após lavagem; 3- sobrenadante após dessorçãodo SMMP-octil 100%; 4- suporte SMMP-octil 100% após dessorção; 5- suporte SMMP-octil 75% após lavagem; 6- sobrenadante após dessorçãodo SMMP-octil 75%; 7- suporte SMMP-octil 75% após dessorção



De um modo geral, a adsorção na presença de debris em todos os suportes SMMPs foi eficiente em relação à BTL-2, no entanto não foi seletiva. Isso pode ter acontecido devido à alta força iônica do meio que favoreceu a adsorção de outras proteínas contaminantes por interação hidrofóbica (AMERSHAM, 2001). O procedimento de dessorção, no entanto, não foi eficiente para nenhuma das condições testadas, pois até mesmo no caso do suporte SMMP-octil 25%, onde o rendimento de dessorção da atividade teoricamente adsorvida ao suporte foi de 100%, ainda foi possível observar algumas proteínas adsorvidas ao suporte através dos experimentos de SDS-PAGE. É importante ressaltar que foram empregadas no procedimento de dessorção condições otimizadas a para dessorção de BTL-2 adsorvida em condições diferentes (pH 7,0 e baixa força iônica) das empregadas neste procedimento. Uma vez que as condições de adsorção foram diferentes, a lipase e as demais proteínas contaminantes se encontram unidas ao suporte de forma diferente. É possível portanto, que para dessorver de forma eficiente estas proteínas, seja necessário utilizar condições de dessorção diferentes das

empregadas. Estudos adicionais são necessários para otimizar o procedimento de dessorção da BTL-2 adsorvida em SMMps-octil na presença de debris celulares.

4.10 Imobilização de BTL-2 em SMMps

BTL-2 é uma lipase e, como já discutido anteriormente, lipases apresentam grande potencial de uso em diversos setores da indústria (SHARMA et al, 2001). Em muitos casos lipases são empregadas na forma imobilizada, pois a imobilização permite a recuperação e reuso de enzimas com consequente redução de custos. A BTL-2 por ser uma lipase termoestável apresenta grande potencial de aplicação industrial e por isso tem sido tema de alguns trabalhos de imobilização de enzimas (PALOMO et al., 2002; PALOMO et al., 2004a; PALOMO et al., 2004b; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; BOLIVAR et al. 2009; MENDES et al., 2012; GODOY et al., 2011a). Em muitos desses trabalhos, BTL-2 tem sido imobilizada com sucesso em suportes hidrofóbicos (PALOMO et al., 2002; PALOMO et al., 2004a; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; MENDES et al., 2012). Os procedimentos de adsorção hidrofóbica testados aqui para a purificação da BTL-2 em suportes hidrofóbicos são, em síntese, muito parecidos com os procedimentos comumente empregados para a imobilização de enzimas em suportes hidrofóbicos. Desta forma, decidiu-se avaliar a BTL-2 adsorvida em SMMps ativados com diferentes densidades de grupos octil do ponto de vista de um processo de imobilização de enzimas. Os derivados obtidos da adsorção da BTL-2 em sílica-octil e agarose-octil também foram testados para comparação. Os resultados da imobilização são apresentados nas seções seguintes.

4.10.1 Imobilização da lipase BTL-2 dialisada em diferentes suportes hidrofóbicos

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a adsorção da lipase BTL-2 nos suportes Sílica-octil e SMMp-octil ativados com densidades de 25, 50, 75 e 100% de grupos octil e agarose-octil do ponto de vista de um procedimento de imobilização de enzimas. Inicialmente avaliou-se o procedimento de imobilização através da medida de atividade de hidrólise da tributirina e também por esterificação conforme o item 3.3.18.

Foi medida a atividade por esterificação e hidrólise de tributirina da enzima livre dialisada e concentrada 3x empregando desidratação em açúcar. No caso da enzima livre dialisada não foi possível medir de forma confiável a atividade de esterificação, pois como a

enzima se encontra muito diluída nessa amostra o volume necessário para medir a atividade implicava adição de quantidades muito elevadas de água no meio reacional, o que atrapalhava a reação. Nesses casos, para calcular a atividade recuperada (AR) por esterificação foi calculado um fator de conversão para transformar atividade de hidrólise (U_{TBU}) em atividades de esterificação (U_{EST}), esse fator de conversão foi de $6,55 U_{EST}/U_{TBU}$. A atividade recuperada foi calculada conforme a Equação 10 descrita no item 3.3.18. A Tabela 4.16 mostra as atividades de esterificação medidas nos diferentes derivados SMMp-octil e sílica-octil, em agarose-octil, da enzima livre e do derivado comercial Lipozyme IM TL (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) para efeito de comparação.

Comparando os diferentes derivados de BTL-2 obtidos neste estudo e também a Lipozyme, o que mostrou maior atividade de esterificação foi o derivado de BTL-2 imobilizada em sílica-octil 75% ($1378 U_{EST}/g$) seguido pelo SMMp-octil 25% ($1357 U_{EST}/g$). O derivado sílica-octil 75% apresentou maior RA_E calculado por hidrólise de TBU o que pode explicar sua alta atividade de esterificação.

Tabela 4.16 - Atividade de esterificação: da BTL-2 livre utilizando amostra concentrada 3x; BTL-2 imobilizada em agarose-octil, sílica-octil e SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% (massa úmida); Lipozyme (derivado comercial) (massa seca). Reação a 300 rpm, 37°C a partir de 0,1M 1-butanol e 0,1M ácido butírico em heptano por 5 min.

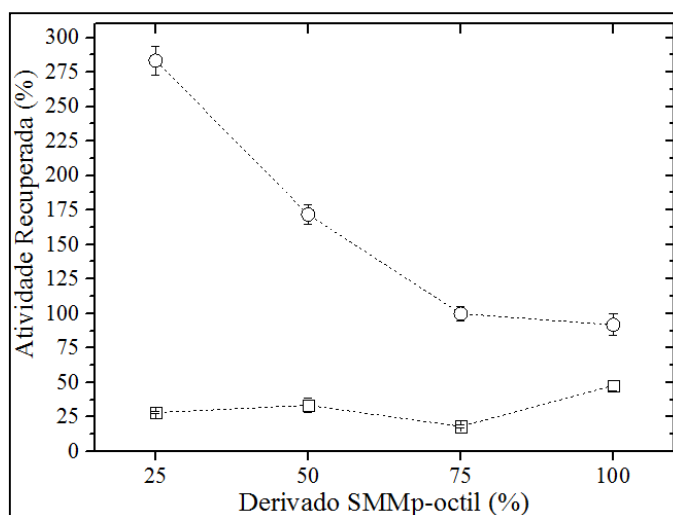
Derivado	Atividade Esterificação (U_{EST}/g)
BTL-2 Livre Concentrada	$1017 U_{EST}/mL \pm 14$
Sílica-octil 25%	407 ± 4
Sílica-octil 50%	742 ± 43
Sílica-octil 75%	1378 ± 6
Sílica-octil 100%	550 ± 93
SMMp-octil 25%	1357 ± 49
SMMp-octil 50%	849 ± 36
SMMp-octil 75%	1021 ± 56
SMMp-octil 100%	840 ± 71
Agarose-octil	536 ± 20
Lipozyme	763 ± 88

No entanto, nos derivados de SMMp-octil esse comportamento não se repetiu uma vez que o derivado SMMp-octil 75% com maior RA_E por hidrólise de TBU apresentou menor atividade de esterificação ($1021 U_{EST}/g$) que o derivado SMMp-octil 25% ($1357 U_{EST}/g$). O derivado de agarose-octil que obteve alto valor de RA_E apresentou o menor valor de atividade

de esterificação entre todos os derivados (536 U_{EST}/g). A baixa atividade de esterificação medida no derivado pode indicar que a lipase não foi imobilizada em sua conformação ativa. Uma vez que o experimento de adsorção de BTL-2 apresentou resultados muito diferentes para os suportes testados é esperado que os derivados apresentem atividades de esterificação diferentes. No entanto, alguns derivados apresentaram atividades de esterificação muito maiores do que a prevista.

A Figura 4.25 mostra a atividade recuperada (AR) nos derivados de SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% medida por hidrólise de tributirina e esterificação. A maior AR, quando medida por hidrólise de TBU, foi obtida do derivado SMMp-octil 100% (47% AR). Quando realizada atividade por esterificação AR foi maior no derivado SMMp-octil 25% alcançando 283%. A atividade recuperada maior que 100% (hiper-ativação) é um indício de que a lipase foi adsorvida ao suporte com a “lid” aberta pela interação entre a face interna da “lid” e a área ao redor do sítio ativo da lipase com a superfície hidrofóbica do suporte, fenômeno este já relatado por Fernandez-Lorente et al. (2008). Nesse mesmo trabalho, Fernandez-Lorente et al. imobilizaram diferentes lipases por ativação interfacial em quatro suportes diferentes, hexyl-ethyl-toyopearl e butyl- e octil-agarose, verificando que a BTL-2 aumentava a atividade (p-NPB) em um fator de duas vezes quando imobilizada em butyl-agarose, octil-agarose ou hexyl-toyopearl e 1,5 vezes quando imobilizada em butyl-toyopearl.

Figura 4.25 - Gráfico da atividade recuperada da lipase BTL-2 nos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% medida por hidrólise de (□) tributirina e (○) esterificação.



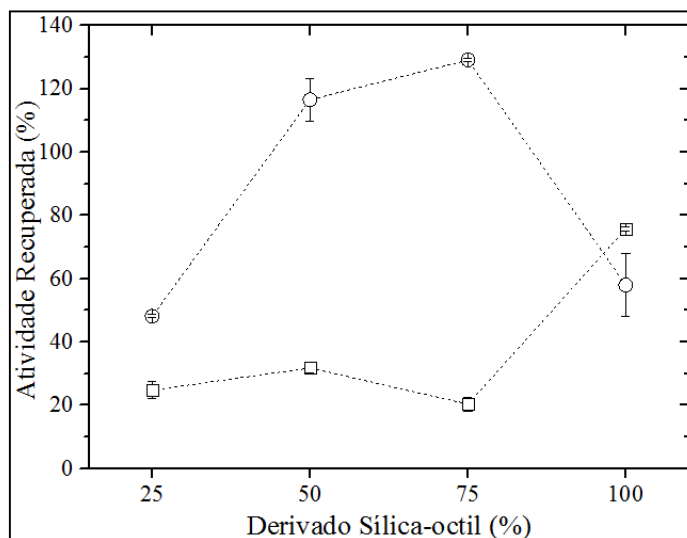
É possível observar que a AR foi maior quando calculada por atividade de esterificação do que por hidrólise de TBU, para todos os derivados de SMMp-octil. O fato do suporte ser extremamente hidrofóbico pode ter dificultado a difusão do substrato no interior do

suporte diminuindo a atividade hidrolítica, ou também ocasionado alteração conformacional na estrutura da BTL-2 que diminuiu sua atividade hidrolítica.

A Figura 4.26 mostra a AR nos derivados de sílica-octil 25, 50, 75 e 100% medida por hidrólise de tributirina e esterificação. A maior At_{Rec} quando medida por hidrólise de TBU foi obtida para o derivado SMMp-octil 100% (75% AR). Quando realizada atividade por esterificação AR foi maior no derivado SMMp-octil 75% alcançando 129%, destacando novamente efeito de hiperativação da enzima quando medida atividade por esterificação. É importante ressaltar mais uma vez que apesar do método de ativação das SMMps e sílica com grupos octil ter sido praticamente o mesmo, ambos os materiais são muito diferentes em termos de morfologia e até mesmo de química de superfície, neste caso uma comparação direta entre os resultados obtidos para ambos os suportes pode não ser possível.

Quando comparada a atividade recuperada dos derivados de BTL-2 imobilizados em SMMp-octil e sílica octil contendo diferentes densidades de grupos reativos em sua superfície calculados por medidas de atividade de hidrólise e de esterificação é possível verificar que a atividade recuperada por hidrólise foi baixa para todos os derivados testados, principalmente os SMMps. No entanto a atividade recuperada por esterificação foi muito alta, principalmente para os derivados SMMps. Esses resultados indicam que a imobilização em suportes hidrofóbicos favorece a atividade de esterificação da enzima e dificulta a atividade hidrolítica. De forma interessante, o suporte SMMp-octil 25% foi o que rendeu melhores resultados em termos de atividade recuperada medida por esterificação, para os derivados SMMp quanto menor a densidade de grupos octil na superfície do suporte, maior a atividade recuperada. Já para os suportes sílica-octil essa tendência, apesar de não tão clara, se manteve sendo os derivados sílica-octil 50 e 75% os melhores em termos de atividade recuperada medida por esterificação. Esta tendência pode significar que nos suportes ativados com menor densidade de grupos octil a interação hidrofóbica entre a enzima e o suporte é mais seletiva, em suportes menos hidrofóbicos a tendência é que a BTL-2 seja imobilizada exclusivamente pela região mais hidrofóbica da sua estrutura, que é a região do Lid favorecendo a hiper-ativação (Figura 4.8). Já com o aumento da densidade de grupos octil na superfície do material, a BTL-2 pode ser adsorvida por outras regiões menos hidrofóbicas na estrutura da proteína, que neste caso são muitas (Figura 4.4). Sendo a enzima imobilizada por orientações diferentes do Lid a tendência é que sejam obtidos derivados sem efeito de hiper-ativação, e em alguns casos com alterações conformacionais que diminuam sua atividade catalítica. A diferença em resultados de atividade recuperada para os derivados SMMp-octil e sílica octil pode indicar diferenças morfológicas e de química de superfície dos materiais.

Figura 4.26 - Gráfico da atividade recuperada da lipase BTL-2 nos suportes Sílica-octil 25, 50, 75 e 100% medida por hidrólise de (□) tributirina e (○) esterificação.



A atividade recuperada de BTL-2 medida em agarose-octil foi baixa tanto por hidrólise de TBU (31,44%) quanto por esterificação (6,10%) (Tabela 4.17). Esse resultado diverge do encontrado por Fernandez-Lorente et al. (2008) que observou aumento da atividade da enzima BTL-2 em um fator de 2x quando imobilizado em agarose-octil (substrato p-NPB). Vale ressaltar que para as medidas de atividade de esterificação o derivado foi lavado com terc-butanol, assim como os demais derivados, antes do experimento de hidrólise. Este procedimento pode ter colapsado os poros do agarose-octil diminuindo seu desempenho nos procedimentos de esterificação ou até mesmo favorecido a dessorção da enzima por interferir com as interações hidrofóbicas. Mendes (2009) obteve rendimento de imobilização de 87% e atividade recuperada de 17% para BTL-2 imobilizada covalentemente em glioxil-agarose e rendimento de imobilização de 100% e atividade recuperada de 31,5% na lipase adsorvida fisicamente em pó de poli-(hidróxibutirato) (atividade medida por hidrólise de p-NPB).

Tabela 4.17 - Dados de atividade recuperada da lipase BTL-2 em agarose-octil medidos por atividade hidrólise de tributirina e esterificação. AR: Atividade Recuperada

Derivado	AR Hidrólise TBU (%)	AR Esterificação (%)
Agarose-octil	31,44 ± 4,70	6,10 ± 0,23

Para avaliar melhor os derivados obtidos através da imobilização de BTL-2 em SMMp-octil ativados com diferentes densidades de grupos octil empregamos os diferentes derivados em um experimento longo de esterificação. A Figura 4.27 mostra o efeito do tempo na conversão em ésteres formados quando oferecidas 1000 U_{EST} de BTL-2 imobilizada nos diferentes suportes de SMMp-octil. Nota-se que a conversão acontece de forma muito rápida na primeira hora e diminui consideravelmente após duas horas e meia de reação. Os melhores resultados foram alcançados para os derivados SMMp-octil 25 e 100%, que apresentaram conversão de 27,31% e 27,63% (Tabela 4.18). Já os derivados de SMMp-octil 50 e 75% apresentaram conversão de 19,67% e 20,43%, respectivamente.

É importante ressaltar que neste experimento fixou-se a atividade de esterificação oferecida durante a reação, desta forma foram adicionadas massas variáveis de catalisador ao meio reacional, já que a atividade de esterificação foi diferente para cada derivado (Tabela 4.18). Assim, eram esperadas conversões muito próximas para os diferentes experimentos, no entanto os resultados indicam que os derivados obtidos apresentam além de atividades recuperadas diferentes, desempenhos diferentes em reações longas. Esses desempenhos diferentes podem refletir efeitos de micro ambiente, ou alterações conformacionais na BTL-2 por interagirem com o suporte. Segundo Fernandez-Lorente et al. (2008) lipases ao se adsorverem em diferentes suportes podem adotar conformações tridimensionais diferentes, podendo envolver mais ou menos grupos da enzima no processo de adsorção, adsorvendo mais fortemente ou não em diferentes suportes e tendo, consequentemente diferentes estabilidades e características catalíticas.

Mendes et al. (2012) imobilizaram a lipase BTL-2 por adsorção hidrofóbica em poly-hidróxi (butirato) (PHB) contendo dois diferentes diâmetros médios de partícula, um considerado pequeno de 75–90 μm (SPHB) e outro grande de 750-1180 μm (LPHB). Os autores observaram rendimento de imobilização de 100% em SPHB e 67,2% em LPHB e atividade recuperada de 15,8% em SPHB e 6,3% em LPHB na hidrólise de azeite de oliva emulsionado. Segundo os autores, a diferença de rendimento de imobilização com o tamanho da partícula está relacionada ao problema de difusão dos agregados bimoleculares que reduz o rendimento de imobilização quando o tamanho da partícula aumenta. A baixa atividade recuperada foi justificada pela baixa acessibilidade do substrato azeite de oliva ao sítio ativo da lipase (limitação difusional). Nesse mesmo trabalho, também foi realizada a síntese de butirato de butila ao longo de 24h e a BTL-2 imobilizada em SPHB e LPBH alcançou conversões de 80 a 90%, apresentando resultados promissores na reação de esterificação. A BTL-2 não apresentou atividade catalítica de transesterificação em meio orgânico.

Figura 4.27 - Gráfico do efeito do tempo na conversão em ésteres utilizando atividade fixa de 1000 U_{EST} empregando BTL-2 Livre e imobilizada em SMMp-Octil 25, 50, 75 e 100% em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; 4h.; (□) SMMp-Octil 100%; (◇) SMMp-Octil 75%; (△) SMMp-Octil 50%; (*) SMMp-octil 25%.

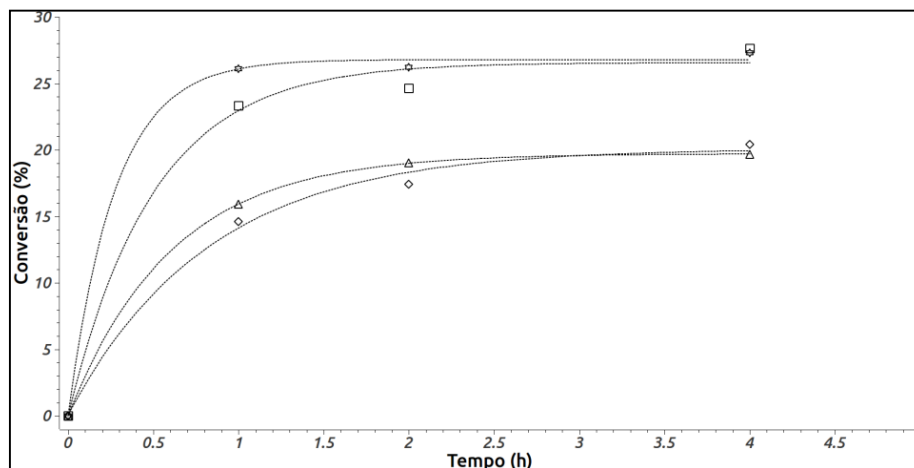


Tabela 4.18 - Dados da conversão de esterificação utilizando atividade fixa de 1000 U_{EST} empregando BTL-2 Livre e imobilizada em SMMp-Octil 25, 50, 75 e 100% em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; 4h

Derivado	Massa Oferecida (g)	Conversão (%)
SMMp-octil 25%	0,74 g	27,31
SMMp-octil 50%	1,18 g	19,67
SMMp-octil 75%	0,98 g	20,43
SMMp-octil 100%	1,20 g	27,63

4.11 Imobilização da lipase BTL-2 em uma única etapa

Assim como a purificação de enzimas, a imobilização de enzimas em uma única etapa é algo extremamente interessante, pois dessa forma é possível diminuir o número de etapas e consequentemente o tempo e custo necessário para realizar um determinado processo. Desta forma, nesta etapa foi medida a atividade recuperada dos derivados SMMp-octil (25, 50, 75 e 100%) contendo BTL-2 adsorvida em sua superfície diretamente na solução de rompimento celular contendo detritos celulares. Para avaliar a atividade recuperada no derivado foi medida a atividade por esterificação e hidrólise de tributirina da enzima livre concentrada por desidratação em açúcar para que se pudesse relacionar a atividade enzimática da BTL-2 pelos dois métodos, permitindo assim calcular a atividade recuperada no derivado também por

esterificação, conforme descrito no item 3.3.18. A Tabela 4.19 mostra as atividades medidas nos diferentes derivados SMMp-octil e do derivado comercial Lipozyme IM TL (lipase de *Thermomyces lanuginosus*) para efeito de comparação.

Entre os derivados de BTL-2 e a Lipozyme o que mostrou maior atividade de esterificação foi o derivado SMMp-octil 25% (1807 U_{EST}/g) seguido pelo SMMp-octil 50% (1668 U_{EST}/g). O derivado SMMp-octil 25% apesar de ter obtido baixo RA_E (30,63%) obteve atividade de esterificação alta, assim como o SMMp-octil 100% que teve atividade de 1622 U_{EST}/g e RA_E 28,13%. O derivado comercial Lipozyme apresentou a menor atividade de esterificação (763 U_{EST}/g). Todos os derivados preparados por adsorção da BTL-2 em SMMps apresentaram resultados altos de atividade de esterificação com valores absolutos muito semelhantes. Vale ressaltar que essas medidas foram realizadas de forma cuidadosa em uma condição onde a conversão foi inferior a 8%, de forma que a atividade enzimática se encontrasse na região de velocidade inicial.

Tabela 4.19- Atividade de esterificação: BTL-2 adsorvida em SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% (massa úmida) direto de debris celulares; Lipozyme (derivado comercial) (massa seca). Reação à 300 rpm, 37°C a partir de 0,1M 1-butanol e 0,1M ácido butírico em heptano por 5 min.

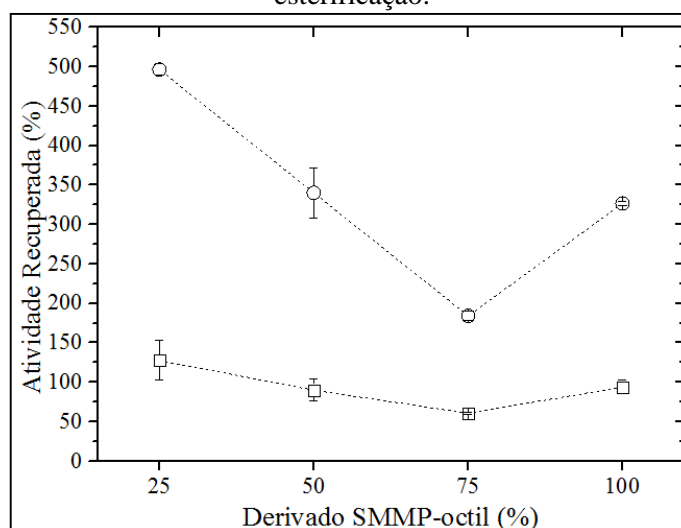
Derivado	Atividade Esterificação (U_{EST}/g)
SMMp-octil 25%	1807 ± 26
SMMp-octil 50%	1668 ± 157
SMMp-octil 75%	1560 ± 54
SMMp-octil 100%	1622 ± 11
Lipozyme	763 ± 88

A Figura 4.28 mostra AR nos derivados de SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% medida por hidrólise de tributirina e esterificação. Nota-se que usando a medida de atividade por esterificação todos os suportes apresentaram AR superior ao inicial aumentando a atividade em quase 5 vezes em alguns casos (SMMP-octil 25%). A maior AR foi obtida com derivado SMMp-octil 25%, nos dois métodos, sendo 127% por hidrólise de tributirina e 496% por esterificação. Somente a adsorção em SMMp-octil 25% resultou em hiper-ativação da enzima para atividade de TBU. Curiosamente o suporte SMMp-octil 75% com maior RA_E obteve menor AR dentre os derivados, sendo 60% e 184% para hidrólise de TBU e esterificação, respectivamente. Kopp et al. (2015), imobilizaram a lipase de *Pseudomonas fluorescens* em SMMp-octil obtendo uma atividade recuperada de 163% medida também por esterificação. Já

Palomo et al (2004a) imobilizaram a BTL-2 em octadecil-sepabeads que gerou atividade enzimática 1,2 vezes maior que a enzima solúvel, já a imobilização em glioxil-agarose, PEI-agarose e DEAE-agarose diminuíram a atividade da enzima em 30%, 10% e 10% respectivamente (atividade medida com o substrato p-NPP).

Comparando os derivados obtidos no processo de imobilização da BTL-2 em uma única etapa com os resultados da enzima dialisada imobilizada em SMMps podemos verificar que existe uma tendência para aumento da atividade recuperada do derivado com a redução da densidade de grupos octil na superfície do material. Como discutido anteriormente isso pode ser um efeito da orientação da imobilização da enzima na superfície do material, no entanto esses procedimentos de imobilização foram realizados em condições distintas dos anteriores. Nas condições de alta força iônica empregadas as interações hidrofóbicas são favorecidas logo a enzima pode ter sido adsorvida por regiões menos hidrofóbicas, até em SMMps contendo baixa densidade de grupos octil, adsorção em múltiplas camadas também pode ter ocorrido.

Figura 4.28 - Gráfico da atividade recuperada da lipase BTL-2 adsorvida diretamente dos debris celulares nos suportes SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% medida por (□) tributirina e (○) esterificação.

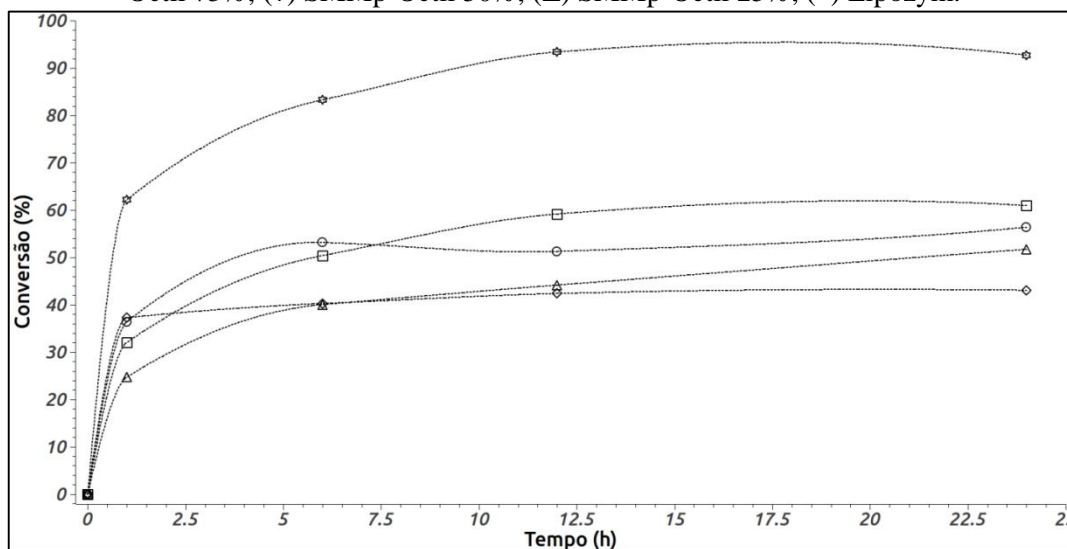


A fim de avaliar o potencial dos derivados obtidos por adsorção direta em debris celulares como biocatalizadores na reação de esterificação do butirato de butila foi realizado um experimento de esterificação por 24 horas, e calculado a conversão final do processo. Neste experimento, diferentemente do realizado anteriormente com BTL-2 dialisada em SMMps, foram oferecidas massas fixas (1g massa úmida) dos derivados SMMp-octil 25, 50, 75 e 100% e também da Lipozym IM TL (1g massa seca) para efeito de comparação com uma lipase

imobilizada comercial. O procedimento foi realizado conforme item 3.3.19 e os resultados encontram-se na Figura 4.29.

O derivado da Lipozyme que obteve baixa atividade de esterificação (atividade inicial) conforme item 4.10.1, obteve maior conversão (92,72%) dentre os derivados analisados. Depois da Lipozyme, o SMMp-octil 75% apresentou maior conversão (60,93%), comportamento distinto do observado para a At_{Rec} que foi o pior dentre os suportes. SMMp-octil 50% apresentou a menor conversão dentre os derivados, 43,06%. Os derivados Lipozyme e SMMp-octil 50 e 75% tiveram conversão até 15 horas aproximadamente, depois desse tempo a reação não evoluiu. Os derivados SMMp-octil 25 e 100% ainda obtiveram um pequeno aumento na conversão após 15 horas de reação.

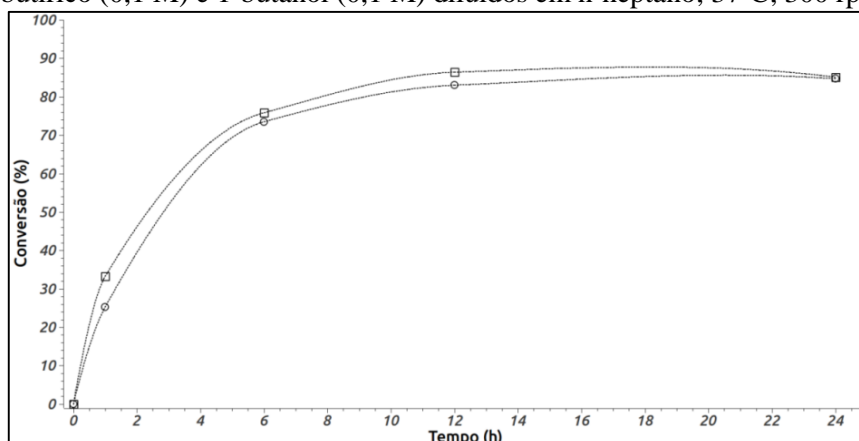
Figura 4.29 - Gráfico da influência do tempo na esterificação utilizando 1g de BTL-2 imobilizada por adsorção direta na presença de debris nos diferentes suportes SMMp-Octil 25, 50, 75 e 100% e 1 g (massa seca) do derivado Lipozym em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; 24h. (○) SMMp-Octil 100%; (□) SMMp-Octil 75%; (◇) SMMp-Octil 50%; (△) SMMp-Octil 25%; (*) Lipozym.



Mesmo apresentando velocidades iniciais de esterificação elevadas, nenhum dos derivados testados rendeu conversões superiores a 60%. Para tentar avaliar se esse efeito foi uma limitação do suporte ou da enzima realizamos um experimento longo de esterificação empregando enzima livre altamente concentrada (aproximadamente 3000 UEST/mL) oferecendo 0,5 mL (1500 UEST) e 1 mL (3000 UEST). De acordo com a Figura 4.30 a esterificação com enzima livre concentrada teve conversão final de 84,67% quando oferecida 0,5 mL de enzima e 85,10% quando oferecido 1mL de enzima. A conversão se tornou estável com aproximadamente 12h de reação. Estes resultados foram extremamente interessantes já que ao dobrar a concentração de enzima empregada, a atividade enzimática não aumentou e

ambos os experimentos resultaram em quase a mesma conversão. Experimentos adicionais necessitam ser realizados, mas ao que tudo indica a BTL-2 não alcança conversões de 100% nas condições de reação empregadas.

Figura 4.30 - Gráfico da influência do tempo de esterificação utilizando BTL-2 Livre (concentrada 3x.) em dois volumes diferentes: 0,500 mL (○) e 1 mL (□) em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; 24h.

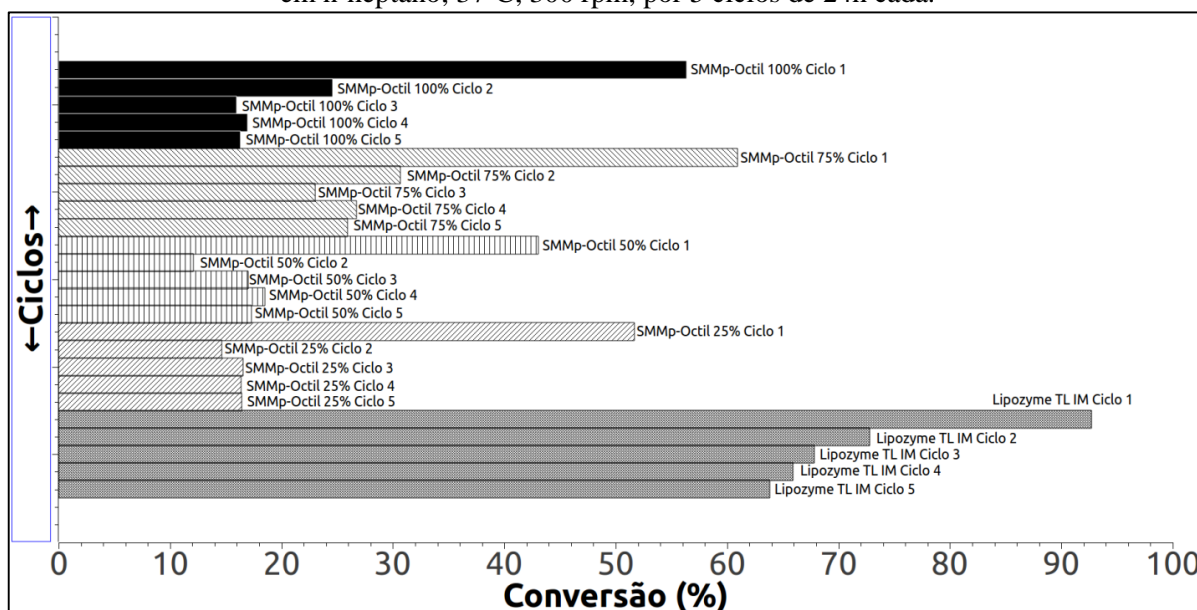


Os derivados de BTL-2 imobilizada em SMMps e o derivado Lipozyme IM TL foram testados em vários ciclos reacionais de esterificação. Após 24h de reação os derivados foram lavados com álcool terciário e utilizados em novos ciclos de esterificação, realizados exatamente nas mesmas condições reacionais, totalizando 5 ciclos. Os resultados encontram-se na Figura 4.31. O derivado comercial Lipozyme apresentou maior conversão no primeiro ciclo (92,72%) obteve queda no segundo ciclo para aproximadamente 72% de conversão. Nos ciclos seguintes o mesmo derivado obteve quedas menores de conversão chegando ao quinto ciclo com aproximadamente 63% de conversão. Os derivados SMMp-octil de um modo geral obtiveram quedas bruscas do primeiro para o segundo ciclo sendo que o SMMp-octil 25% passou de 51 para 14% de conversão, o SMMp-octil 50% passou de 43 para 12%, o SMMp-octil 75% passou de 60 para 30% de conversão e SMMp-octil 100% passou de 56 para 25% de conversão. A queda brusca na conversão no segundo ciclo de reação para todos os derivados SMMp pode ter ocorrido por inativação da BTL-2 ou por dessorção de enzima adsorvida para o meio reacional. Lipases são muito estáveis em meio orgânico (BORNSCHEUER; KAZLAUSKAS, 2006), logo a dessorção parece ser a alternativa mais provável. A adsorção da BTL-2 na presença de detritos celulares foi realizada em valores mais elevados de força iônica, nessas condições a lipase pode ter se adsorvido na superfície do material por regiões menos hidrofóbicas ou até mesmo em múltiplas camadas (PALOMO et al., 2004b), essas ligações são mais facilmente quebradas ocasionando dessorção da enzima para o meio reacional.

O derivado SMMp-octil 25% manteve aproximadamente a mesma conversão até o último ciclo (16%). Já SMMp-octil 50% obteve conversão ligeiramente maior no terceiro ciclo (17%) em relação ao segundo e manteve a conversão aproximada até o último ciclo. O derivado SMMp-octil 75% obteve aproximadamente 26% de conversão em seu último ciclo e o SMMp-octil 100% manteve aproximadamente a mesma conversão nos três últimos ciclos (16%).

Apesar da queda inicial os derivados de BTL-2 adsorvidos diretamente dos debrís celulares em SMMp-octil demonstraram potencial aplicação para purificação/imobilização da enzima com possibilidade de reuso por vários ciclos demonstrando ser um suporte interessante para a imobilização de enzimas. Melhorias no método de imobilização em uma única etapa combinando adsorção hidrofóbica e ligação covalente pode solucionar o problema da queda de atividade do derivado após o primeiro ciclo reacional.

Figura 4.31 - Dados do Reuso da BTL-2 imobilizada por adsorção direta na presença de debrís celulares nos diferentes suportes SMMp-Octil 25, 50, 75 e 100% e 1 g (massa seca) e do derivado Lipozym em volume reacional de 10 mL contendo ácido butírico (0,1 M) e 1-butanol (0,1 M) diluídos em n-heptano; 37°C; 300 rpm; por 5 ciclos de 24h cada.



4.12 Estudo da adsorção de BTL-2 em SMMp-octil 75% e 100% na presença de etanol

Paralelamente ao desenvolvimento dessa dissertação foram conduzidos estudos com o objetivo de melhorar as características das SMMps para aplicações em bioprocessos, principalmente no que diz respeito a estrutura de poros do material. Nesses estudos, através de alterações sutis nas condições de processo foi possível obter materiais com maior área de

superfície e poros maiores chamados de SMMps G2 (geração 2) (dados não publicados), o que pode favorecer a adsorção de proteínas na superfície do material. Com base nos resultados preliminares da aplicação desse material em outros estudos conduzidos no DEQ-UFSCar foi decidido testar as SMMps melhoradas na recuperação da BTL-2. As SMMps produzidas foram ativadas com grupos octil na concentração de 100 e 75% nas mesmas condições descritas anteriormente. Nesta etapa do trabalho foi avaliada também a adsorção da BTL-2 em SMMp octil (100 e 75%) na presença de etanol conforme item 3.3.20. Segundo Blanco et al. (2007) a imobilização de lipases em superfícies funcionalizadas com grupos octil pode ser melhorada com a presença de etanol. O mesmo autor afirma que a concentração de até 10% de etanol não afetou negativamente a atividade da lipase livre (CALB) utilizada no referido trabalho.

Dessa forma foram realizados experimentos de adsorção da lipase BTL-2 dialisada e do lisado celular com e sem etanol 10% v/v. As adsorções foram realizadas em SMMp com 75%, que apresentou os melhores resultados, e com o SMMp-octil 100% que obteve menores rendimentos de adsorção devido a alta hidrofobicidade, condição ideal para testar o efeito da adição de etanol ao sistema reacional. Os ensaios foram realizados com enzima BTL-2 dialisada e também com o lisado celular cujo rompimento celular foi feito conforme item 3.3.1. Os resultados da adsorção com a enzima dialisada e com o lisado celular encontram-se na Tabela 4.20 e 4.21 respectivamente.

A adsorção da BTL-2 dialisada em tampão fosfato 5 mM pH 7,0 com e sem etanol na concentração de 10% pode ser observada na Tabela 4.20. A adsorção da lipase em tampão fosfato na ausência de etanol apresentou resultados superiores ao observado anteriormente para o material ativado com grupos octil 100% e resultados muito similares ao observados anteriormente para SMMps ativadas com grupos octil 75%, ambos apresentaram rendimentos de imobilização de 90%, o que pode ser considerado um resultado ótimo. Os dados obtidos para o SMMp octil 100% indicam que a alteração na estrutura de poros das SMMps pode favorecer a adsorção de proteínas, conforme esperado. A adição de etanol na concentração de 10% (v/v) teve um efeito negativo na adsorção da BTL-2 reduzindo o rendimento de adsorção para valores na casa dos 60%. A adição de etanol pode favorecer a adsorção de proteínas em sólidos porosos hidrofóbicos pois facilita a difusibilidade da molécula alvo no interior do material, no entanto a presença de etanol pode contribuir para um rearranjo da estrutura secundária da proteína (Blanco et al.; 2007) que pode tanto facilitar quando reduzir a tendência de adsorção de uma determinada proteína. A BTL-2 é uma proteína que apresenta alta tendência de agregação em solução formando complexos macromoleculares que podem dificultar o acesso da proteína no interior dos poros do material (SCHMIDT-DANNERT et al.,

1997), ou até mesmo bloquear regiões hidrofóbicas na superfície da proteína impedindo possíveis interações hidrofóbicas. Isso pode explicar a queda no rendimento de adsorção da proteína na presença de etanol 10% (v/v).

Tabela 4.20 - Adsorção da Lipase BTL-2 dialisada em SMMp-octil 75 e 100% na proporção de 1:10 m/v, pH 7,0 (5 mM), 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

SMMp-octil	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
75%	339,91	4,24	90,87	87,7	77,28	80,08
75% Etanol	239,64	3,09	62,33	63,9	79,54	77,57
100%	337,76	4,39	90,90	91,3	77,28	76,92
100% Etanol	268,58	3,20	69,28	65,7	79,54	83,94

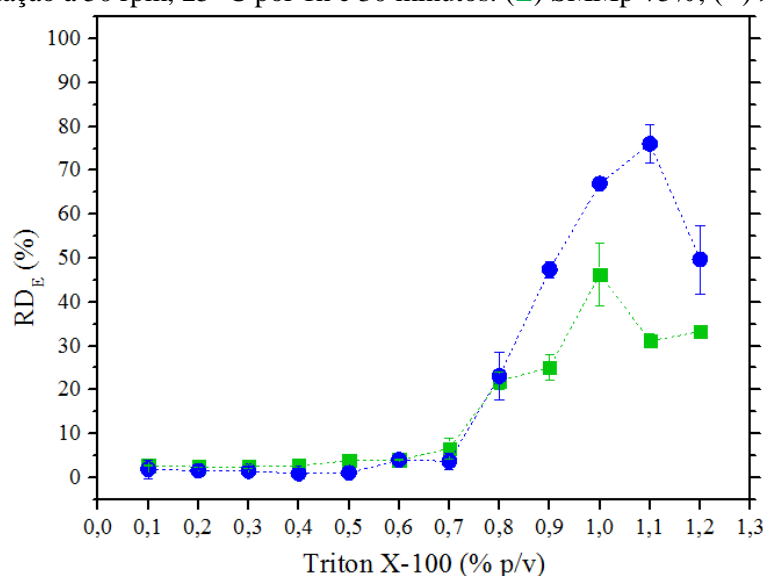
Conforme pode ser observado na Tabela 4.21 o rendimento de adsorção da BTL-2 da solução após rompimento celular em SMMp-octil 100 e 75% foi acima de 96% para todos os experimentos realizados empregando SMMps G2 ativadas com grupos octil, esse resultado foi superior ao observado anteriormente quando as SMMps geração 1 (G1) foram empregadas, indicando que a alteração na estrutura de poros do material favoreceu a adsorção da lipase. Como a adsorção atingiu valores próximos a 100% para todos os experimentos realizados, não foi possível observar nenhuma diferença com relação a presença de etanol. A adsorção no SMMp-octil 100% com etanol obteve maior RA_E de 99,08% e atividade teórica adsorvida de 588,96 U_{TBU}/ml de suporte. Aparentemente as adsorções realizadas na presença de etanol foram mais seletivas em relação as adsorções sem etanol observados pelo aumento da atividade específica teórica no derivado em relação a atividade específica inicial e pelo menor RA_P nas adsorções na presença de etanol.

Para estudo da dessorção da enzima dos suportes provenientes da adsorção em lisado celular, que foi a condição que apresentou os melhores resultados, foi utilizado o surfactante Triton X-100 nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 e 1,2% (m/v). O procedimento de dessorção foi realizado conforme o item 3.3.20. As Figuras 4.32 e 4.33 mostram respectivamente o RD_E e atividade dessorvida em função da concentração de Triton X-100 usada na dessorção.

Tabela 4.21 - Dados de adsorção da BTL-2 da solução após rompimento celular contendo debris celulares em suspensão usando SMMp-octil 75% e 100% na proporção de 1:10 m/v, 25° C por 6 h em shaker orbital a 50 rpm. At_{Tea} : atividade teórica adsorvida. Pt_{Tea} : proteína teórica adsorvida. RA_E : rendimento de adsorção da enzima. RA_P rendimento de adsorção da proteína. AE_0 : atividade específica no controle ao final do processo. AE_{TD} : atividade específica teórica no derivado

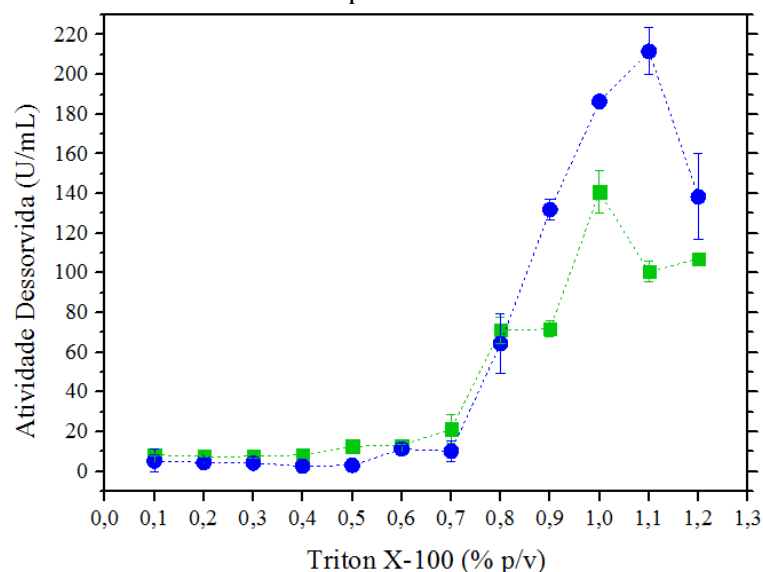
SMMp-octil	At_{Tea} (U_{TBU}/ml suporte)	Pt_{Tea} (mg/ml suporte)	RA_E (%)	RA_P (%)	AE_0 (U_{TBU}/mg proteína)	AE_{TD} (U_{TBU}/mg proteína)
75%	469,47	5,36	96,83	99,94	90,46	87,65
75% Etanol	582,33	5,20	97,64	90,98	104,43	112,08
100%	468,29	5,31	96,11	98,50	90,46	88,27
100% Etanol	588,96	5,20	99,08	91,31	104,43	113,32

Figura 4.32 - Gráfico do RD_E de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 75% e 100%, variando-se a concentração de Triton X-100 de 0,1% a 1,2% (m/v). Dessorção em pH 7,0 (5 mM), na proporção de 1:10 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-75%; (●) SMMp-octil 100%



O maior RD_E e atividade desorvida ocorreu com o uso de 1% Triton X-100 no suporte SMMp-octil 75% e 1,1% no suporte SMMp-octil 100%, sendo que o SMMp-octil 100% obteve maior RD_E (76,06%) e maior atividade desorvida de 227,57 U/mL. Para o SMMp-octil 75% o maior RD_E foi de 46,35% e maior atividade desorvida de 151,37 U/mL de suporte. Esses resultados diferenciam dos resultados encontrados por Schmidt-Dannert et al. (1996), ao incubarem a lipase BTL-2 em Triton X-100 na concentração de 1% por 1h 30 min a enzima perdeu totalmente sua atividade.

Figura 4.33 - Gráfico da atividade desorvida de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 75% e 100%, variando-se a concentração de Triton X-100 de 0,1% a 1,2% (m/v). Dessorção em pH 7,0 (5 mM), na proporção de 1:5 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) SMMp-75%; (●) SMMp-octil 100%



Depois de variada a concentração de Triton X-100 na desorção da lipase foi selecionada a concentração de 1,0% m/v e então foi variado o pH da solução de desorção em pH 6,0; 7,0 e 9,0 a fim de obter maior rendimento de desorção. Os resultados de RDE e atividade desorvida em função do pH encontram-se nas Figuras 4.34 e 4.35 respectivamente. É possível observar que não houve variação significativa na desorção da BTL-2 em função do pH para o suporte SMMp-octil 100%, nesse material praticamente 100% dos grupos silanol são convertidos a grupos octil, de forma que somente interações hidrofóbicas entre a lipase e o material são possíveis e portanto a desorção, assim como a adsorção, não é dependente do pH da solução. Já para a desorção da BTL-2 adsorvida em SMMp-octil 75% é possível observar uma diferença no rendimento de desorção em função do pH, nesse material a substituição dos grupos silanol por octil não é total restando alguns grupos silanol na superfície do material que podem adquirir carga negativa (ILER, 1979). Uma vez que o suporte SMMp octil 75% possui carga é esperado que haja alguma influência na desorção da BTL-2 em função do pH, principalmente em baixa força iônica como é o caso do experimento. A desorção realizada em pH 5,0 proporcionou maior desorção a partir do suporte SMMp-octil 100%, sendo o RDE de 74,19% e atividade desorvida de 221,98 U/mL de suporte. Já na desorção da enzima do suporte SMMp-octil 75%, a desorção em pH 7,0 continuou sendo a melhor condição de desorção.

Figura 4.34 - Gráfico da atividade desorvida de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 75% e 100%, usando Triton X-100 1,0% (m/v). Dessorção em tampão fosfato (5 mM), na proporção de 1:5 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) pH 5,0; (■) pH 7,0; (■) pH 9,0

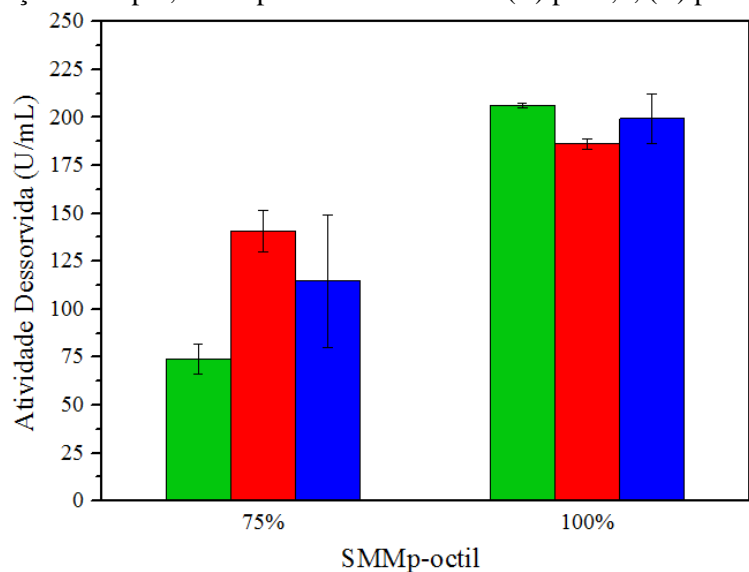
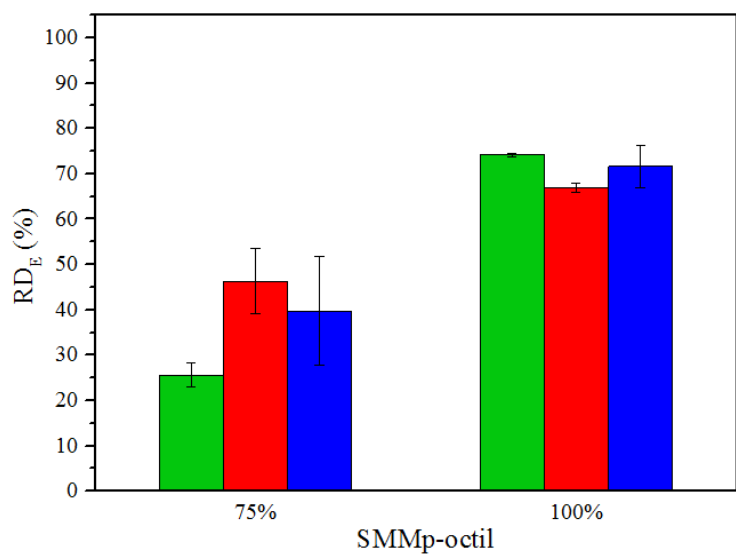


Figura 4.35 - Gráfico do RD_E de Lipase BTL-2 dos suportes SMMp-octil 75% e 100%, usando Triton X-100 1,0% (m/v). Dessorção em tampão fosfato (5 mM), na proporção de 1:5 m/v sob agitação à 50 rpm, 25° C por 1h e 30 minutos. (■) pH 5,0; (■) pH 7,0; (■) pH 9,0



5 CONCLUSÕES

Suportes magnéticos têm ganhado atenção, pois a sua separação é relativamente rápida, fácil, de baixo custo e de alta eficiência, podendo purificar e imobilizar biomoléculas em uma única etapa. Neste estudo foram utilizadas micropartículas magnéticas de sílica (SMMps) para recuperação da lipase 2 de *Bacillus thermocatenuatus* (BTL-2). A densidade de grupos octil na superfície do suporte da SMMp foram modificadas com as porcentagens teóricas de 25%, 50% e 75% e 100% de grupos octil. SMMp-octil ativado com 75% de grupos octil se mostrou a melhor condição para adsorção alcançando RA_E de 92,87% (374,33 U_{TBU}/ml), resultado similar à agarose-octil (93,93%). A sílica macroporosa comercial foi selecionada para comparação dos procedimentos de ativação com diferentes densidades de grupos octil e para todas as variações de densidade de grupos octil a atividade e a proteína adsorvida por volume de suporte foi superior no suporte SMMp.

A recuperação da BTL-2 direta do lisado celular contendo de debris celulares mostraram maior RA_E (71,25%) para SMMp-octil 75%, comportamento similar ao apresentado pela enzima centrifugada e dialisada, embora com rendimento menor devido à presença de mais contaminantes. A dessorção da BTL-2 dos suportes realizada usando as condições otimizadas obteve maior RD_E do suporte SMMp-octil 25% de 108% (136,79 U_{TBU}/ml) usando Triton X-100 0,4 % (m/v) com NaCl 0.25M, cuja adsorção foi realizada na presença de debris celulares. Todos os suportes SMMps testados podem ser empregados na separação de proteínas de interesse na presença de outros sólidos em suspensão de forma eficiente reduzindo assim o número de etapas do processo de purificação do bioproduto. Faz-se necessário, contudo, dar continuidade a esse estudo, particularmente na caracterização de estrutura interna do suporte para permitir melhor modulação deste para a finalidade desejada.

Testes da enzima adsorvida como catalisador mostraram que o derivado SMMp-octil 75% apresentou conversão de 60,93% na síntese de butirato de butila em 24h. Os derivados de BTL-2 adsorvidos diretamente dos debris celulares em SMMp-octil foram utilizados em ciclos e apresentaram conversão satisfatória no primeiro ciclo mas que diminuiu nos ciclos seguintes.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar diferentes grupos funcionais para adsorção da lipase em SMMp;
- Caracterizar o suporte SMMp ativado com diferentes densidades de grupos octil;
- Investigar outros protocolos para dessorção da lipase do suporte SMMp-octil;
- Avaliar o desempenho dos derivados de SMMp-octil em reação de transesterificação;
- Testar imobilização em uma única etapa combinando adsorção hidrofóbica e ligação covalente.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 589-595, 2003.
- ALTARUGIO, M. L. **Purificação de Penicilina G Acilase Recombinante Produzida Extra e Intracelularmente**. 2014. 93f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Protein Purification: Handbook**. 2001.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, vol. 3. **São Paulo: Edgard Blücher**, 2001.
- ARRUDA, Eduardo José de Concentração e purificação de β -amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosanafenilboronato. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- AYYAR, B. V., ARORA, S., MURPHY, C., O'KENNEDY, R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. **Methods**, v. 56, n. 2, p. 116-129, 2012.
- BARBOSA, O., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, Á., TORRES, R., RODRIGUES, R. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435-456, 2015.
- BEISSON, F., TISS, A., RIVIERE, C., VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p. 133-153, 2000
- BOLIVAR, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; GODOY, C.; RODRIGUES, D. S.; RODRIGUES, R. C.; BATALLA, P.; ROCHA-MARTÍN, J.; MATEO, C.; GIORDANO, R. C. L.; GUISÁN, J. M. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 477-483, 2009.
- BON, E. P. S; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BORNSCHEUER, U. T., KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in organic synthesis: regio-and stereoselective biotransformations**. John Wiley & Sons, 2006.

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, 1976.

BRINKER, C. J., SCHERER, G. W. **Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing**. Academic press, 2013.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores imobilizados. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**.v. 9, n. 36. Disponível em <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio36/biocatalizadores_36.pdf>. Acesso em: 27 de Fevereiro de 2016.

CARRASCO-LÓPEZ, C., GODOY, C., DE LAS RIVAS, B., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J. M., GUISÁN, J. M., HERMOSO, J. A. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the BTL2 lipase from the extremophilic microorganism *Bacillus thermocatenuatus*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 64, n. 11, p. 1043-1045, 2008.

CARRASCO-LÓPEZ, C., GODOY, C., DE LAS RIVAS, B., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J. M., GUISÁN, J. M., HERMOSO, J. A. Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, p. 4365-4372, 2009.

CARVALHO, P. de O., CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. D. A., DE OLIVEIRA, J. G., SHIMIZU, M. T., DA SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CHON, J. H., ZARBIS-PAPASTOITSIS, G. Advances in the production and downstream processing of antibodies. **New Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 458-463, 2011.

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

DE ABREU, L., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. C., VOLPATO, G., AYUB, M. A. Z. Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 51-55, 2014.

CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Uso De Sílicas Modificadas Para

Imobilização De Lipases. **Quím. Nova**, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2015.

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

DENNISON, C. **A Guide to Protein Isolation**. 2 ed. London: Springer, 249 p. 2003.

DURMAZ, E.; KUYUCAK, S.; SEZERMAN, U. O. Modifying the catalytic preference of tributyrin in *Bacillus thermocatenulatus* lipase through in-silico modeling of enzyme–substrate complex. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 26, n. 5, p. 325–333, 2013.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ARMISÉN, P., SABUQUILLO, P., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1, p. 185-197, 1998.

FERNANDEZ-LORENTE, G.B, CABRERA, Z.A, GODOY, C.A, FERNANDEZ-LAFUENTE, R.A, PALOMO, J.M.A, GUISAN, J.M.A. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061-1067, 2008.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GODOY, C. A.; MENDES, A. A.; LOPEZ-GALLEGO, F.; GRAZU, V.; DE LAS RIVAS, B.; PALOMO, J. M.; HERMOSO, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2553-2561, 2008.

FERREIRA, A. L. de O. **Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado**. 2004. 190f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

FRANZREB, M.; SIEMANN-HERZBERG, M.; HOBLEY, T. J., THOMAS, O. R. T. Protein purification using magnetic adsorbent particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 505-516, 2006.

GODOY, C. A., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., DE LAS RIVAS, B., FILICE, M., GUISAN, J. M., PALOMO, J. M. Medium engineering on modified *Geobacillus thermocatenulatus* lipase to prepare highly active catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, n. 3, p. 144-148, 2011 a.

GODOY, C. A., RIVAS, B. D. L., GRAZÚ, V., MONTES, T., GUISÁN, J. M., LÓPEZ-GALLEGO, F. A tailor-made support for site-directed rigidification of proteins. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1800-1809, 2011b.

GUISÁN, J.M. **Immobilization of Enzyme and Cells**. 2. ed. In: Walker, J. M. (ed.) *Methods in Biotechnology*, Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2006.

HARRISON, R. G., TODD, P., RUDGE, S. R., PETRIDES, D. P. **Bioseparations Science and Engineering**. Oxford University Press, USA, 2015.

HEALTHCARE, G. E. Affinity Chromatography: Principles and Methods. 2007a. In: GE HealthCare Handbooks. Disponível em <http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/Affinity_chromatography_handbook.pdf>. Acesso em 11 de Março de 2016.

HEALTHCARE, G. E. Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography: Principles and Method. 2007b. In: GE HealthCare Handbooks. Disponível em: http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Hydrophobic%20Interaction%20Chromatography.pdf. Acesso em 11 de Março de 2016.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, S., GARCÍA-GARCÍA, M. I., & GARCÍA-CARMONA, F. Purification, immobilization and characterization of lipase isoenzyme from *Aspergillus niger* with C8 magnetic particles. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 5, n. 7, p. 633, 2014.

ILER, R. K. **The Chemistry of Silica**: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry. Canada: John Wiley & Sons Inc., 1979.

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

KARIMI, E., KARKHANE, A. A., YAKHCHALI, B., SHAMSARA, M., AMINZADEH, S., TORKTAZ, I., SAFARI, Z. Study of the effect of F17A mutation on characteristics of *Bacillus thermocatenuatus* lipase expressed in *Pichia pastoris* using in silico and experimental methods. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2014.

KOPP, W. **Síntese e ativação superficial de novos suportes magnéticos para imobilização de enzimas**. 2013. 190 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química/Departamento de Física, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LENINGHER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p.233.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Pcessos fermentativos e enzimáticos**. v.3. São Paulo: Blucher, 2001.

LIMA, Lionete Nunes de. **Síntese enzimática de ésteres catalisada por lipases imobilizadas em diferentes suportes**. 2013. 152 f. Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, 2013.

LINKE, D. BERGER, R. G. Foaming of proteins: New prospects for enzyme purification processes. **Journal of Biotechnology**, v. 152, p. 125-131, 2011.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, p. 1559-1568, 2010.

MARCIELLO, M., BOLIVAR, J. M., FILICE, M., MATEO, C., & GUIBAN, J. M. Preparation of lipase-coated, stabilized, hydrophobic magnetic particles for reversible conjugation of biomacromolecules. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 3, p. 602-607, 2013.

MCCUE, J. T. Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. In: BURGESS, R. R.; DEUTSCHER, M. P. **Guide to Protein Purification**. 2 ed. London: Academic Press, 2009. p.405-414, (Methods in Enzimology, v. 463)

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: Influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 1055-1066, 2011a.

MENDES, A. A., OLIVEIRA, P., CASTRO, H., GIORDANO, R. de L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011b.

MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C., VÉLEZ, A. M., GIORDANO, R. C., DE LC GIORDANO, R., DE CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503-511, 2012.

MENDES, A. A., DE CASTRO, H. F., GIORDANO, R. de L.C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.

MINOVSKA, V.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 70, n. 4, p. 609-624, 2005.

MOTEVALIZADEH, S. F., KHOOBI, M., SADIGHI, A., KHALILVAND-SEDAGHEH, M., PAZHOUHANDEH, M., RAMAZANI, A., SHAFIEE, A. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 75-83, 2015.

NAWANI, N., KHURANA, J., & KAUR, J. A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus sp.*: purification and characterization. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, n. 1-2, p. 17-22, 2006.

PALOMO, J. M., MUÑOZ, G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, p. 279-286, 2002.

PALOMO, J. M., SEGURA, R. L., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PERNAS, M., RUA, M. L., GUISÁN, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. **BiotechnologyProgress**. v. 20, n. 2, p. 630-635, 2004a.

PALOMO, J. M., ORTIZ, C., FUENTES, M., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUISAN, J. M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1, p. 267-273, 2004b.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, vol. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PESELA, B. C., MATEO, C., CARRASCOSA, A.V., VIAN, A., GARCÍA, J.L., RIVAS, G., ALFONSO. C., GUIBAN. J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE. R. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of a Thermophilic poly-his-tagged α -galactosidase from thermus sp. strain t2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy sephabeads. **Biomacromolecules**.v.4, p.107-113, 2003.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**, 1º ed.; Manole: Barueri, p. 2-5, 2005.

PINOTTI, L. M. **Produção e purificação de penicilina G acilase**. 2003. 270 p. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. Springer, 2007.

PRLAINOVIC, N. Z.; BEZBRADICA, D. I.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. D.; STEVANOVIC, S. I.; IVIC, M. L. A.; USKOKOVIC, P. S.; MIJIN, D. Z. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on multi walled carbon nanotubes. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, p. 279-285, 2013.

QUYEN, D. T., SCHMIDT-DANNERT, C., SCHMID, R. D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. **Protein Expression and Purification**, v. 28, n. 1, p. 102-110, 2003.

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

ROSENHOLM, J. M., CZURYSZKIEWICZ, T., KLEITZ, F., ROSENHOLM, J. B., LINDÉN, M. On the nature of the Brønsted acidic groups on native and functionalized mesoporous siliceous SBA-15 as studied by benzylamine adsorption from solution. **Langmuir**, v. 23, n. 8, p. 4315-4323, 2007.

RÚA, M. L., SCHMIDT-DANNERT, C., WAHL, S., SPRAUER, A., SCHMID, R. D. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*: large-scale production,

purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 89-102, 1997.

RUO-BING, S., ZHI-CHAO, Z., LEI, C., QIAN-HONG, W. Magnetic silica microspheres as a novel support for immobilized metal affinity purification of proteins/peptides. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 628-632, 2007.

SCHMIDT-DANNERT, C., SZTAJER, H., STÖCKLEIN, W., MENGE, U., SCHMID, R. D. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**. v. 1214, n. 1, p. 43-53, 1994.

SCHMIDT-DANNERT, C., RUA, M. L., ATOMI, H., SCHMID, R. D. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1301, n. 1, p. 105-114, 1996.

SCHMIDT-DANNERT, C., RUA, M. L., WAHL, S., SCHMID, R. D. *Bacillus thermocatenulatus* lipase: a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, n. 1, p. 178-182, 1997.

SCOPES, ROBERT K. Protein purification: principles and practice. Springer Science & Business Media: Nova York, 2013

SECUNDO, F.; MIEHE-BRENDLE, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E. E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 350-361, 2008.

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

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. C. L.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16-24, 2012a.

SILVA, G.S. **Imobilização de lipase em matriz polimérica para produção de bioaroma**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

SOARES, C. M., DE CASTRO, H. F., DE MORAES, F. F., ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, n. 1-3, p. 745-757, 1999.

TIMUCIN, E., SEZERMAN, O. U. Zinc modulates self-assembly of *Bacillus thermocatenulatus* lipase. **Biochemistry**, v. 54, n. 25, p. 3901-3910, 2015.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipase production. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, n.2, p.182-196, 2010.

VÉLEZ, A. M.; LUPERNI HORTA, A. C.; DA SILVA, A. J.; DA COSTA LEMMA, M. R.; CAMARGO GIORDANO, R. D. L.; ZANGIROLAMI, T. C. Enhanced production of recombinant thermo-stable lipase in *Escherichia coli* at high induction temperature. **Protein Expression And Purification**, v. 90, p. 96-103, 2013.

VESCOVI, V. **Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres**. 2012.79 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

VOLPATO, G., FILICE, M., AYUB, M. A., GUI SAN, J. M., PALOMO, J. M. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 4, p. 473-478, 2010.

WANG, J., MENG, G., TAO, K., FENG, M., ZHAO, X., LI, Z., XU, H., XIA, D., LU, J. R. Immobilization of lipases on alkyl silane modified magnetic nanoparticles: Effect of alkyl chain length on enzyme activity. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. e43478, 2012.

WANG, P., ZHAO, J. Q., JIANG, Z. J., LIU, Y. C., LIU, S. M. Preparation of magnetic iron/mesoporous silica composite spheres and their use in protein immobilization. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 19, p. s605-s610, 2009.

WU, W.; HE, Q. G.; JIANG, C. Z. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, p. 397-415, 2008.

ZHU, Y. T., REN, X. Y., LIU, Y. M., WEI, Y., QING, L. S., LIAO, X. Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles:

Characterization and application for enzymatic inhibition assays. **Materials Science and Engineering: C**, v. 38, p. 278-285, 2014