

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPOS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Ediane de Sá Alves

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICO DE LIPASE ÁCIDA
PRESENTE NA SEMENTE DE MAMONA**

São Carlos - SP

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICO DE LIPASE ÁCIDA
PRESENTE NA SEMENTE DE MAMONA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Raquel de Lima Camargo Giordano

Co-Orientação: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano

São Carlos/SP

2019

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE EDIANE DE SÁ ALVES APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 26 DE FEVEREIRO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:


Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, UFSCar


Paulo Waldir Tardioli
UFSCar


Willian Kopp
Kopp Technologies

AGRADECIMENTOS

A minha família, minha mãe Edna, minha avó Eponina, minha irmã Eliete e meu pai Antônio, por sempre me apoiarem e serem meu porto seguro. Sei que nunca vou estar sozinha pois tenho vocês.

Aos meus orientadores Profa. Dra. Raquel e Prof. Dr. Roberto, pela orientação, pelo conhecimento e experiência compartilhada, e por confiarem em meu trabalho. A contribuição de vocês foi fundamental para a concretização deste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório e amigos do Enz 1 e Enz 2, Laiane, Renato, Aninha, Letícia, Manu, Murilo, Thais e Felipe, vocês foram essenciais para o sucesso deste trabalho, afinal tudo o que sei de experimentos e ensaios laboratoriais foram vocês quem me ensinaram. Um obrigado especial ao Felipe que tanto me ensinou sobre meu tema e me deu ajudas importantes para a realização deste trabalho. Aos meus amigos do Enz 1, também quero agradecer por deixarem meus dias no laboratório menos entediados. Obrigada pelas conversas e risadas.

À *fubazada* e agregados Bruna, Alan, Ju, Felipe, Ana e Reginaldo que me levaram as melhores festas de São Carlos e pela amizade.

Meu muito obrigada especial a Ju, Mary e Thiago, vocês foram muito importantes para essa conquista. Obrigada pela amizade, incentivo, conselhos, cuidado e tantas outras atitudes que nem sei listar. Ju, você foi minha grande companheira nesse mestrado, desde as matérias até o ensaio para a defesa, você esteve presente em todos os momentos.

Meu muito obrigada aos amigos do DEQ que não contribuíram no texto da dissertação ou nos experimentos realizados, mas certamente fizeram meus dias mais alegres. Pode ter sido uma conversa no corredor, um bombom para adoçar um dia difícil de trabalho ou um café na copinha.

Agradeço também aos meus amigos do kiau, os amigos da trupe e minha família por me incentivarem e torcerem pelo meu sucesso.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química que contribuíram para a minha formação; em especial ao Prof. Dr. Paulo Tardioli e Prof. Dr. Marcelo Ribeiro pelas contribuições feitas ao trabalho. À UFSCar e aos órgãos financiadores desta pesquisa: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001.

Processo de nº 2016/10636-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). “As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

Pelo financiamento da bolsa de estudos, materiais e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Sem o apoio de vocês não seria possível atingir essa conquista.

Muito Obrigada!

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido.

Agora é a hora de entender mais, temer menos.”

- Marie Curie

RESUMO

Diversos estudos sobre a lipase ácida da semente da mamona já foram conduzidos, mas estes utilizaram, em sua maioria, a enzima na forma de extrato sólido da semente (ESM), obtido através da moagem e remoção do óleo. Já foram realizados estudos cinéticos da hidrólise de óleo com enzima nessa forma, mas os parâmetros obtidos são aparentes por se tratar de um sistema heterogêneo. Nesse contexto, a extração da enzima permitiria eliminar possíveis efeitos difusivos com uso de ESM. O objetivo deste trabalho foi buscar as melhores condições de extração da enzima da semente, para conduzir então o estudo cinético da enzima solúvel. O estudo da extração foi realizado através do contato do ESM com tampões em diferentes pHs. Os resultados demonstram que há aumento da extração com o aumento do pH e que há baixa atividade específica da enzima em pH 6. Isso indica que uma extração sequencial, primeiro em pH 6, seguido de outra extração em pH maior apresentaram melhores resultados que a extração em etapa única. Os melhores resultados foram obtidos na extração sequencial em tampão fosfato de sódio 50 mM, inicialmente pH6 e em seguida pH 7 com 0,5 % de triton X-100. Nesta condição, obteve-se rendimento de extração de 78% e atividade específica de 1,89 (U_{TBU}/mg). Em seguida, a lipase livre foi concentrada por ultrafiltração em membrana de 30 KDa e o seu volume foi reduzido em 10 vezes, acarretando em um aumento na atividade específica para 2,77 (U_{TBU}/mg). A enzima solúvel obtida foi aplicada na catálise da hidrólise do óleo de soja. A velocidade de reação depende da área interfacial formada pelas gotas de óleo e pela água. Assim, fez-se o estudo da influência da agitação na velocidade inicial de hidrólise. Os resultados mostram que em um sistema reacional de 50 mL de volume e impedidor de 3 pás, a velocidade de reação aumenta com a agitação até 1000 rpm, ficando constante com rotações maiores. Esta condição foi utilizada para realizar os experimentos cinéticos. Na temperatura de 37–40°C e pH 4,5, verificou-se máxima atividade para enzima livre. Após escolher uma concentração adequada de enzima (região linear da curva $V_i=f(C_e)$), estudou-se a influência da concentração do substrato (óleo) na velocidade inicial de hidrólise. O modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato já foi utilizado para estudar a mesma reação com ESM, tendo um bom ajuste aos dados experimentais $V_i=f(C_s)$. Foram estimados os parâmetros cinéticos intrínsecos $V_{M\acute{a}x}/U_{hid}$ ($30,7 \times 10^{-4} \pm 0,88 \times 10^{-4} \text{ mmol.U}_{hid}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), K_m ($49,264 \pm 2,37 \text{ mM}$) e K_s ($866,80 \pm 108,79 \text{ mM}$). Quando comparados estes valores aos obtidos usando a enzima na forma ESM, são esperados que os valores de $V_{M\acute{a}x}/U_{hid}$ sejam maiores e os de K_m menores para a enzima solúvel, indicando a presença de efeitos difusionais quando o ESM é usado. Portanto o K_s não varia, ele representa a influência da coalescência das gotas de óleo para altas concentrações, o que implica na diminuição da concentração de substrato, representando o modelo de inibição pelo substrato. Este fenômeno é similar na enzima solúvel ou ESM.

ABSTRACT

Several studies have been conducted regarding acidic lipase from castor bean seed, most of them using the enzyme in the form of solid seed extract (SSE), which is extracted through grinding and removal of the oil. Kinetic studies of the oil hydrolysis catalyzed by SSE have already been done, but the estimated parameters are apparent, since it is a heterogeneous system where the substrates are found in different liquid phases while the enzyme is found in solid phase. In this context, enzyme extraction would eliminate possible diffusive effects from the use of SSE. The objective of this research was to find the best conditions for extracting the enzyme from the seed in order to perform the kinetic study of the soluble enzyme. Once obtained, the soluble enzyme was used in the soybean oil catalysis under different conditions. The reaction speed depends on the interfacial area formed by oil drops and water. Thus, a study of the influence of stirring conditions in the hydrolysis initial speed. The results shows that in a reactional system, using 50 mL of reactional volume and a 3-bladed impeller, the initial hydrolysis velocity increases with the stirring rotation up to 1000 rpm, keeping constant for higher rotation speeds. These conditions were used to perform the kinetic study. The maximum activity for free enzyme was verified at the temperature of 37-40 ° C. After choosing an adequate enzyme concentration (linear region of the curve $V_i=f(C_e)$), the influence of substrate (oil) in the hydrolysis initial speed was studied, at pH of 4,5 and temperature of 37° C. A Michaelis-Menten model with substrate inhibition has been used to study the same reaction catalyzed by SSE and had good fitting to the experimental data $V_i=f(C_s)$. The estimated intrinsic kinetic parameters were $V_{M\acute{a}x}/U_{hid}(30,7 \times 10^{-4} \pm 0,88 \times 10^{-4} \text{ mmol.Uhid}^{-1}.\text{min}^{-1})$, $K_m(49,264 \pm 2,37 \text{ mM})$ e $K_s(866,80 \pm 108,79 \text{ mM})$. When comparing these values and those obtained using enzyme in the SSE form, the values of $V_{M\acute{a}x}/U_{hid}$ were higher and the value of K_m was smaller for the soluble enzyme, indicating the presence of diffusional effects when SSE is used. Accordingly, the parameter K_s did not change, as it represents the influence of the oil drops coalescence for high oil concentrations, implicating on a decrease of substrate concentration, represented in the model as a kinetic substrate inhibition. This phenomenon was similar using either soluble or SSE enzyme.

Lista de Figuras

- Figura 1** Reação de hidrólise de triglicerídeo, formando glicerol e ácido graxo. 2
- Figura 2** Representação do perfil de velocidade em função da variação da concentração de substrato, em uma reação que segue o mecanismo de Michaelis – Menten..... 8
- Figura 3** Sequência de aminoácidos da lipase ácida da semente de mamona, a triáde catalítica (S, D, H) está destacado em negrito 13
- Figura 4** Sistema de ultrafiltração: o fluxo de alimentação passa transversalmente a membrana e as partículas menores que ela a permeiam, formando o concentrado e o permeado. ... 16
- Figura 4.1** Atividade enzimática (UTBU/mL) em função do tempo(h), na extração de lipase ácida do extrato sólido de mamona em tampão 50 mM, a 25 graus, em diferentes pHs. = Atividade total (ESM e fase aquosa) = Atividade em fase aquosa..... 27
- Figura 4.2** Concentração de proteínas totais (mg/mL) ao longo do tempo (h) no sobrenadante centrifugado, após extração de proteínas do extrato sólido de mamona em fase aquosa, a 25 graus, em diferentes pHs, 50 mM..... 28
- Figura 4.3** Atividade específica (UTBU/mg) ao longo do tempo (h) no sobrenadante centrifugado, após extração de proteínas do extrato sólido de mamona em fase aquosa, a 25 °C, em diferentes pHs, 50 mM 29
- Figura 4.4** Atividades totais relativas às iniciais (%) após 4 horas de incubação de lipase ácida de mamona (no extrato e solúvel), a diferentes pHs, a 25°C. 30
- Figura 4.5** Atividades relativas à inicial (%) em função do tempo(h), durante incubação de ESM a diferentes pHs, a 25°C..... 30
- Figura 4.6** Atividade enzimática (UTBU/g) em função do tempo (min), durante incubação de ESM a diferentes concentrações de Triton X-100 a 4°C, tampão acetato 50 mM, pH 4,533
- Figura 4.7** Atividade relativa (%) do ESM, após a adição de Triton X-100 a diferentes concentrações..... 33
- Figura 4.8** Eletroforese SDS-Page em condições desnaturantes da lipase de mamona. 1 - marcador molecular de massa peso molecular em kDa; 2 – Extração no ESM da lipase em tampão fosfato pH 6; 3 –Extração no ESM da lipase em extração sequencial pH 7; 4 - Extração no ESM da lipase em extração sequencial em pH 7 com triton 0,5 % (M/V); 5 –

Extração na semente de mamona em pH 10 da camada de óleo; 6 – Extração na semente de mamona em pH 10 da fase aquosa.	36
Figura 4.9 Eletroforese SDS-Page em condições desnaturantes da lipase de mamona. 1 - marcador molecular de massa peso molecular em kDa; 2 – Permeado da ultrafiltração; 3 – Concentrado da ultrafiltração	39
Figura 4.10 Velocidade iniciais (mM/min) em função de diferentes concentrações enzimáticas, para 10% de substrato, 37 °C, pH 4,5, agitação de 1000 RPM.	40
Figura 4.11. Velocidade iniciais (mM/min) da hidrólise de óleo de soja para 10% de substrato, 37 °C, pH 4,5, 0,72 UTBU/mLsolução. Em função de diferentes regimes de agitação, volume de 100 mL e agitação com 1pá, volume de 50 mL e agitação com 1pá e volume de 50 mL e agitação com 3 pás.....	41
Figura 4.12. Velocidades iniciais experimentais e simuladas (mM/min) em função da concentração de óleo de soja (M), após ajuste do modelo cinético de Michaelis – Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais, na hidrólise de óleo catalisada por lipase solúvel de mamona. Reações em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 a 37 °C, sob agitação constante de 1.000 rpm e 0,9 U _{TBU} /mL _{solução}	43
Figura 4.13 Atividade enzimática (UTBU/mL) do lipase livre de mamona em diferentes pHs.	45
Figura 4.14 Atividade enzimática (UTBU/mL) do lipase livre de mamona em diferentes temperaturas.....	45
Figura 4.15 Atividades relativas à inicial (%) ao longo do tempo (h), durante incubação de lipase ácida de mamona solúvel, a diferentes temperaturas. A atividade catalítica foi determinada pela hidrólise da tributirina em tampão acetato 100 mM, pH 4,5 5 a 37°C. Os valores de atividade foram normalizados considerando a atividade em tempo 0h como 100%.	46
Figura 4.16 Velocidade iniciais (mM/min) em função de diferentes concentrações enzimáticas, para 10% de substrato, 37 °C, pH 4,5, agitação de 1000 RPM para diferentes tempos de reação.	47

Lista de Tabelas

- Tabela 1** Efeito dos tipos de inibição na equação de velocidade de Michaelis-Menten 11
- Tabela 2** Extração de lipase da semente de mamona diferentes tampões. 15
- Tabela 4.1** Atividade enzimática (UTBU/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) após extração da lipase ácida da semente de mamona dormente para fase aquosa em tampão 31
- Tabela 4.2** Tabela 4.2. Atividade lipolítica (UTBU/mL) e concentração de proteínas totais(mg/mL) ao longo do tempo (h), na extração de lipase ácida do do ESM em fase aquosa, em pH acetato 4,5, 25 °C e 0,5% (M/V) Triton X-100. Proteínas e atividade medidas no sobrenante centrifugado..... 34
- Tabela 4.3** Tabela 4.3. Atividade lipolítica (UTBU/mL), concentrações de proteínas totais (mg/mL) e atividade específica (UTBU/mg) na extração de lipase ácida de ESM em fase aquosa, a pH6, seguida de extração sequencial a pH 10, sem tensoativo, e em pH 7, com e sem tensoativo. Proteínas e atividade medidas no sobrenadante centrifugado..... 35
- Tabela 4.4** Tabela 4.4. Atividade total (UTBU) extraída em extração sequencial, rendimento de extração (%) e atividade total (UTBU) ESM após extração. Proteínas e atividade medidas no sobrenadante centrifugado 36
- Tabela 4.5** Tabela 4.5. Atividade enzimática (UTBU/mL), Atividade total extraída (UTBU), concentração de proteínas (mg/mL), proteínas totais (mg) e atividade específica (U/mg) após extração de lipase ácida do ESM em fase aquosa, em extração sequencial a pH 6 e depois a pH7, com duas diferentes razões ESM/tampão. Proteínas e atividade medidas no sobrenadante centrifugado 37
- Tabela 4.6** Tabela 4.6. Volume de retentado (mL), Atividade lipolítica (UI/mL) e proteínas totais (mg/mL) antes e depois da concentração da solução de lipase ácida solúvel extraída de ESM em membrana de 30KDa livre da semente de mamona. Volume final(Vf) = 0,1 Vinicial (Vi). 38
- Tabela 4.7** Tabela 4.7. Parâmetros cinéticos (Vmax/UI), Km e Ks estimados pelo ajuste de modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato, aos dados de $V_i=f(C_s)$, na hidrólise de óleo de soja catalisado por lipase ácida de mamona na forma de extrato sólido de mamona (ESM) (CORRADINI et al, 2019) e por lipase ácida extraída de ESM, livre ou solúvel e concentrada (LLM)..... 44

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
LLM	Lipase livre de mamona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EBLB	Extrato Bruto de Lipase de Manona
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESM	Extrato sólido de mamona
K_s	Constante de inibição pelo substrato
K_M	Constante de Michaelis-Menten
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio (sigla em inglês)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
$V_{Máx}$	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2.1 Lipases.....	4
2.2 Cinética enzimática.....	5
2.2.1 Modelos de Inibição.....	9
2.2.2. Cinética da hidrólise de óleo catalisada por lipase.....	11
2.3 Lipase da semente de mamona.....	13
2.4 Extração e purificação de biomoléculas.....	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Materiais.....	18
3.1.1 Sementes e óleos vegetais.....	18
3.1.2 Reagentes consumíveis.....	18
3.2 Métodos.....	18
3.2.1 Métodos Analíticos.....	18
3.2.2 Extração e purificação da lipase ácida de mamona.....	20
3.2.3 Estabilidade enzimática.....	23
3.2.4 Caracterização cinética da enzima:.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
4.1 Extração em fase aquosa e concentração da lipase de mamona.....	26
4.1.1 Extração em fase aquosa em diferentes pHs.....	26
4.1.2 Extração de lipase do ESM utilizando tensoativo.....	32
4.1.3 Extração sequencial.....	35
4.1.3 Influência da razão entre massa de ESM e volume de extração nos parâmetros da extração.....	37
4.1.4 Concentração da lipase da mamona.....	38

4.2 Estudos cinéticos da lipase livre de mamona	39
4.2.1 Influência da concentração enzimática.....	39
4.2.3 Influência da agitação.....	40
4.2.3 Influência da concentração de substrato.....	42
4.2.4 Efeitos de pH e temperatura	45
4.2.5 Estabilidade Térmica	46
5 CONCLUSÕES	48
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

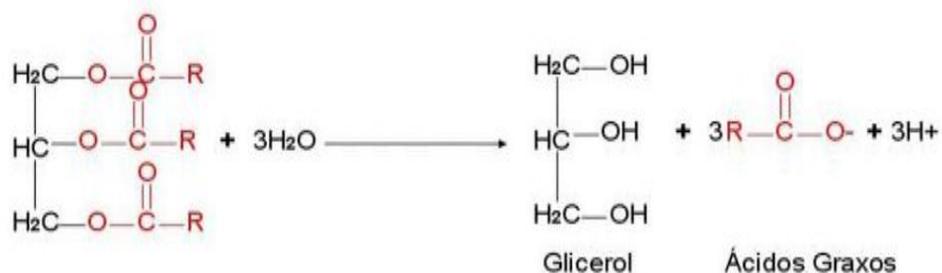
O atual grande desafio das indústrias químicas e aliadas é transformar processos industriais consolidados em manufaturas mais sustentáveis, utilizando matérias-primas de forma eficiente, eliminando o desperdício e evitando uso de materiais tóxicos e perigosos. Atualmente, a maioria dos processos usam catalisadores químicos que demandam altas temperaturas para atingir velocidade razoável de reação, apresentam baixa especificidade, muitas vezes requerem reações anteriores para proteger ligações, geram variados subprodutos indesejados e necessitam de etapas posteriores de separação para recuperar o produto de interesse. (DE CASTRO, 2004).

A hidrólise de óleo e gordura é um processo importante para a obtenção de matérias-primas básicas (ácidos graxos e glicerol) para uma ampla gama de produtos, tais como alimentos, produtos lácteos, sabor, produtos farmacêuticos, biocombustíveis, couro, cosméticos, detergentes e indústrias químicas (JAVED, 2018). A hidrólise, geralmente, é realizada através do processo Colgate-esmeril, onde altas temperaturas de pelo menos 250°C e pressão de quase 4,82 MPa são necessárias para atingir alta conversão, o que acarreta em altos custos de energia e cria condições favoráveis para reações indesejáveis, como oxidação e desidratação (ROONEY; WEATHERLEY, 2001).

A catálise enzimática apresenta-se como uma alternativa excelente, pois enzimas apresentam capacidade de reagir de forma seletiva com o substrato, evitando a produção de subprodutos indesejados, além de serem potentes catalisadores em condições mais brandas de temperatura e pressão. (AL-ZUHAIR, 2003). O principal obstáculo na implementação dos processos enzimáticos na indústria é o custo das enzimas, obstáculo esse que vem sendo reduzido com o advento da tecnologia de DNA recombinante e engenharia de proteínas (LIU et al. 2013). Espera-se um crescimento anual de aproximadamente 7% do mercado mundial de enzimas entre 2015 e 2020 (SINGH et al., 2016).

Devido à versatilidade de suas aplicações, lipases são as enzimas mais utilizadas, seguidas por proteases e amilases (ÜLKER et al., 2011). Lipases (E.C.3.1.1.3) são capazes de realizar hidrólise de triglicerídeos em sistemas macroaquosos, com a liberação de ácidos graxos, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol (Figura 1). Além de hidrólise, essas enzimas são também capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação (alcoólise e glicerólise), acidólise e interesterificação. (JAVED, 2018).

Figura 1 Reação de hidrólise de triglicerídeo, formando glicerol e ácido graxo.



Lipases podem ser produzidas por animais, microrganismos e plantas e possuem diferentes faixas de pH e temperatura de atuação dependendo de sua origem, podendo, pois, serem aplicadas em diferentes processos e configurações de reator. Essas enzimas apresentam a vantagem de levar a um alto rendimento na reação de hidrólise, mas o custo de produção e purificação das lipases microbianas vem inviabilizando sua implantação em processos industriais (AL-ZUHAIR, S.; et al, 2003; DE SOUSA, 2010).

O uso de lipases de origem vegetal pode auxiliar na implementação de processos industriais de hidrólise, pois têm custo menor por não necessitar produção, somente extração (BARROS et al., 2010). Essas lipases podem ser encontradas em sementes de espécies oleaginosas, como a mamona, que possui duas lipases, uma que opera na faixa ácida e outra na neutra (EASTMOND, P. J., 2004). Diferente de outras espécies oleaginosas, a lipase ácida de mamona encontra-se ativa na semente tanto no estágio dormente como durante a fase de germinação, podendo ser explorada diretamente da semente in natura (DE SOUSA et al., 2010; EASTMOND, 2004; SANTOS et al., 2013).

A lipase ácida de mamona se torna então uma opção interessante para a hidrólise de óleos brutos, que possuem alta acidez e podem ter alta umidade (SOARES et al., 2013), pois ela apresenta elevada atividade catalítica em meio ácido. Seu uso permite a redução do custo de hidrólise, dado seu baixo custo comparado ao de enzimas produzidas por microrganismos, além da utilização de óleos não refinados, que tem um valor menor que os óleos beneficiados.

A lipase de mamona vem sendo estudada há anos, resultando em trabalhos sobre sua estrutura, sua caracterização e estudos cinéticos (AVELAR, 2013, BRESSANI, 2014, EASTMOND, 2004, MUTO, 1974, ORY R. L. et al., 1962, ORY R. L. et al., 1969; FUCHS C. et al., 1996, TAVARES, 2018, CORRADINI et al., 2019). Esses estudos, porém, foram realizados utilizando a lipase na forma de extrato sólido da semente (semente moída com remoção do óleo). O estudo das propriedades cinéticas da enzima dessa forma é muito complexo, pois mesmo a reação é intrinsecamente heterogênea já que o substrato da reação é

bifásico, ocorrendo na interface formada pelo substrato e o meio aquoso onde se encontra a enzima. O uso de ESM, forma sólida, introduz nova heterogeneidade ao sistema, já que a enzima haverá agora uma camada líquida estagnada em torno da partícula de semente, o que pode dificultar o encontro entre enzima e substrato (BRESSANI, 2014, CORRADINI et al, 2019). A extração da enzima para a forma solúvel permitiria obtenção dos parâmetros cinéticos intrínsecos desta lipase, uma vez que o atraso difusional que ocorre na travessia da camada estagnada e que afeta as estimativas dos parâmetros cinéticos não mais estaria presente.

Outra dificuldade de aplicação da enzima na forma de extrato sólido (ESM) é a presença da ricina (toxina letal) em sua semente. Devido a essa toxina, a lipase do ESM não pode ser aplicada em indústrias alimentícias e de química fina (GODOY, 2009). Obter a enzima na sua forma solúvel possibilita sua purificação e/ou imobilização, técnicas que permitem a utilização da lipase em processos mais nobres.

Nesse contexto, esse trabalho estudará inicialmente a extração aquosa de lipase ácida de mamona, seguida da caracterização cinética da enzima na forma solúvel, visando contribuir com sua futura utilização na forma purificada e/ou imobilizada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipases

Lipases são enzimas de grande destaque no cenário da biotecnologia devido à variedade de reações que são capazes de catalisar (JAVED, 2018). Elas são classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3), e são capazes de realizar hidrólise de ligações éster-carboxílicas de acilgliceróis, liberando ácidos orgânicos e glicerol. Além disso, quando em meio não aquoso, essas enzimas são capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação, alcoólise ou glicerólise (usando, respectivamente, álcoois ou glicerol), acidólise (usando ácidos graxos livres) e interesterificação (usando ésteres de ácidos graxos distintos) (BARROS, 2010, DE CASTRO et al., 2004).

Geralmente, lipases são estáveis em soluções aquosas neutras em temperatura ambiente, exibindo ótima atividade em temperaturas na faixa de 30 a 40 °C. Contudo, a depender de sua origem, elas podem apresentar atividade na faixa de pH entre 4 e 9 e em temperatura variando de ambiente até 70°C, com massa molecular de 20 a 75 KDa (DE CASTRO et al., 2004). Lipases distintas podem catalisar a mesma reação, podendo entretanto apresentar desempenhos diferentes sob as mesmas condições reacionais (YAHYA et al., 1998).

Lipases atuam em ligações éster de compostos variados, sendo que óleos e gorduras (tanto de origem animal quanto vegetal) são seus principais substratos. Elas são mais ativas em substratos insolúveis, especialmente triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia longa, com mais de 10 átomos de carbono; diferentemente das esterases, que são ativas em substratos solúveis, especialmente ésteres, tais como glicerídeos feitos de ácidos graxos de cadeia curta, com menos de seis átomos de carbono (RIBEIRO et al., 2011, VERGER, 1997).

Uma outra característica importante das lipases é sua especificidade. Essas enzimas podem ser agrupadas em três categorias: (a) especificidade pelo substrato, as lipases apresentam especificidade quanto ao tipo e ao comprimento do ácido graxo, assim como às partes alcoólicas dos substratos; (b) regioespecificidade, as lipases apresentam especificidade posicional em relação ao radical acila. As lipases não específicas apresentam capacidade de atuar nas três posições dos ácidos graxos no esqueleto triacilglicerol, enquanto, as lipases 1,3 – específicas são capazes de distinguir as posições 1 e 3. Ainda existem as lipases que apresentam especificidade pelos grupos de ácidos graxos, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9; e (c) enantioespecificidade, capacidade que algumas lipases possuem de discriminar os enantiômeros de uma mistura racêmica (DE CASTRO et al., 2004). Essas características de especificidade única conferem às lipases

vantagens decisivas em relação aos clássicos catalisadores químicos, já que permitem direcionar a reação para o produto desejado, o que não ocorre com estes, que catalisam reações aleatórias (BARROS, 2010). Dessa forma, esses biocatalisadores modificam a composição de ácidos graxos em óleos e gorduras com precisão, obtendo novos produtos com design físico e propriedades químicas desejadas (VILLENEUVE, 2003).

2.2 Cinética enzimática

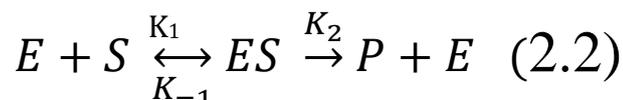
Cinética enzimática é a abordagem mais antiga para compreender o mecanismo de ação das enzimas. Ela se constitui do estudo das reações catalisadas por enzimas e como as condições reacionais influenciam na velocidade de reação, influência essa que pode ocorrer por parâmetros diversos como temperatura, pH, força iônica, concentração de substrato das enzimas e presença de inibidores (LEHNINGER, 2013). Compreender a cinética de reação pode melhorar o rendimento das reações, auxiliando na escolha do tempo de reação, na dimensão dos reatores e na definição de condições experimentais que proporcionem velocidade máxima.

Muitas reações enzimáticas podem ser descritas pelo modelo conhecido como modelo de Michaelis – Menten, mostrado na equação (2.1)

$$V = \frac{V_{max} Cs}{(K_m + Cs)} \quad (2.1)$$

Esse modelo, matematicamente uma hipérbole de reação de primeira ordem, representa bem o comportamento experimental de muitas reações enzimáticas, conforme observado pela primeira vez para a hidrólise de sacarose pela enzima invertase. Os pesquisadores passaram então a buscar uma teoria que permitisse deduzir matematicamente essa hipérbole.

Por analogia com catálise química, foi proposto por Brown o mecanismo de formação de intermediário, como modelo para reações catalisadas por enzima:



E = enzima livre

ES = complexo enzima-substrato

Nesse mecanismo, uma enzima(E) se liga a um substrato (S) para formar o complexo enzima-substrato (ES), em uma reação reversível. A partir do complexo ES se processa a reação, liberando o produto (P) e a enzima livre. A segunda etapa da reação (formação e liberação do produto) acontece mais lentamente que a formação do complexo ES, sendo a etapa limitante da reação (SHULER; KARGI, 2002; BERG et al., 2010).

Segundo esse mecanismo:

Velocidade da reação é governada pela etapa $ES \rightarrow E + P$.

Logo:

$$V = K_2 (ES) \quad (2.2.a)$$

O aumento na concentração de P com o tempo, ou seja, a velocidade da reação, se é verdade a equação 2,2,a, é proporcional à concentração de ES. Então:

- para S pequeno $\rightarrow V \propto S$ (ordem 1)
- para S grande $\rightarrow V$ não depende de S, não é f(S) (ordem zero)

O mecanismo de Brown levava, portanto, a uma hipérbole. Ainda se carecia, contudo, de uma dedução matemática. O mecanismo de Brown explicava a curva experimental, mas era necessário deduzir uma equação do tipo hipérbole. Henri, um cientista francês, deduziu a equação 2.1, atribuída erroneamente a Michaelis e Menten, que na verdade apenas confirmaram experimentalmente a formulação matemática.

Uma vez que a velocidade é proporcional à concentração de ES, a qual não se consegue medir experimentalmente num ensaio cinético típico, era necessário a elaboração de hipótese que permitissem colocar ES em função da concentração inicial (total) de enzima, C_{E0} e de C_S . Duas abordagens foram utilizadas: equilíbrio rápido e estado estacionário. A primeira postula que a formação do complexo ES ocorre logo que se inicia a reação e atinge uma concentração constante, C_{ES} , que permanece constante, pois está em equilíbrio com E e S. Essa abordagem, contudo, somente permite explicar reações enzimáticas onde a velocidade de dissociação do complexo em E + S é muito maior que a de ES em E+P. Quando isso é verdade, a retirada de um S para se transformar em P, não alterava a concentração de equilíbrio do complexo formado. Dessa forma, a concentração do complexo ES poderia matematicamente ser obtida como igual a $C_S.C_E(K_1/K-1)$, sendo C_S a concentração de S no equilíbrio e $K_1/K-1$ igual a constante de equilíbrio na formação do complexo. Observe-se que todas as deduções são referidas a velocidades iniciais de reação, ou seja, para cada concentração inicial de substrato se formava

uma respectiva concentração de ES. Essa abordagem, contudo, não explica muitas reações enzimáticas onde K_2 , que representa a velocidade de dissociação do complexo em E+P, é da mesma ordem de grandeza que K_{-1} , que representa a velocidade de dissociação do complexo em E+S.

Brigs e Haldane, então, propuseram uma abordagem mais geral, postulando a existência de um estado estacionário que ocorreria logo após a formação do complexo, que atingiria uma concentração aproximadamente constante. O valor da concentração desse complexo era diferente do calculado para a concentração de equilíbrio, pois levava em conta a dissociação do complexo também em E+P. O valor de C_{ES} de estado estacionário se obtém escrevendo-se equações diferenciais para a variação de concentração com o tempo das duas formas em que está presente a enzima (E, ES), através dos balanços de massa, e isolando-se o valor de dC_{ES}/dt , que será igualado a zero, pela hipótese de estado estacionário.

A dedução geral do modelo matemático conhecido como modelo MM, para um substrato e uma enzima, utiliza as seguintes hipóteses:

Pelo mecanismo $\rightarrow V=f(C_{ES})=k_2C_{ES}$ (2.3)

1) $\frac{dC_{ES}}{dt} = 0 \rightarrow C_{ES} = C_{E0} \cdot C_S \left(\frac{K_1}{K_2 + K_{-1}} \right)$ (2.4)

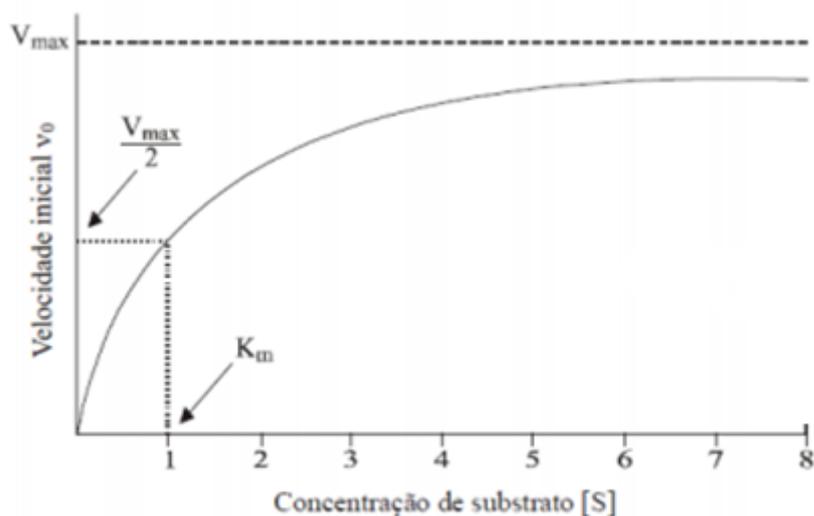
2) $C_{E0} = C_E + C_{ES}$ (2.5)

3) $C_S \gg C_E$ (necessária para se atingir rapidamente a concentração C_{ES} de estado estacionário)

4) Reação irreversível $\rightarrow C_p \approx$ zero, verdade quando a reação é realmente irreversível e sempre quando velocidades iniciais são tomadas (conversão menor que 5%).

A concentração de substrato afeta diretamente a velocidade de reação. Em baixas concentrações de substrato, há pouca formação do complexo ES e conseqüentemente menor velocidade de reação. Já o aumento da concentração de substrato leva ao aumento da velocidade de reação, até que se atinja condição de excesso de substrato, com todas as moléculas de enzima na forma de complexo, atingindo-se assim a velocidade máxima de reação. A partir dessa condição, aumento na concentração de substrato não irá mais causar aumento na velocidade da reação. Esse perfil de reação é apresentado na Figura 2 (BERG et al., 2010; MOTTA, 2011).

Figura 2 - Velocidade em função da variação da concentração de substrato, em uma reação que segue o modelo cinético de Michaelis – Menten.



Fonte: Motta 2011

A velocidade máxima (V_{max}) de uma reação enzimática é alcançada quando todas as enzimas estão na forma do complexo enzima substrato (LEHNINGER, 2013). Propriedade matemática de uma hipérbole de primeira ordem, a constante K_m é a concentração de substrato para a qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima, sendo que quanto menor o valor de K_m , maior é a afinidade da enzima com o substrato e, conseqüentemente, menor a quantidade de substrato necessária para atingir a velocidade máxima. K_m é a correlação entre as constantes intermediárias da reação catalítica (LEHNINGER, 2013; SHULER; KARGI, 2002).

$$V_{max} = K_2 C_{E0} \quad (2.6)$$

$$K_m = \frac{K_2}{K_1} \quad (2.7.a) \text{ (equilíbrio rápido) Ou}$$

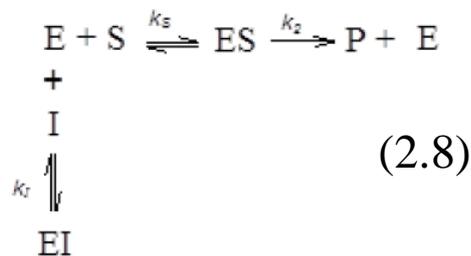
$$K_m = \frac{K_2 + K_1}{K_1} \quad (2.7.a) \text{ (estado estacionário) } \quad (2.7.b)$$

Esse modelo representa bem reações enzimáticas para um substrato (primeira ordem) e de dois substratos onde a concentração molar de um deles é muito maior que a do outro, permanecendo aproximadamente constante (pseudo-primeira ordem), caso de hidrólises. Em alguns casos, onde há presença de grandes concentrações de produto e substrato, esses elementos podem causar a inibição enzimática (BERG et al., 2010). A seguir serão apresentados alguns mecanismos de inibição e os respectivos modelos cinéticos que os representam.

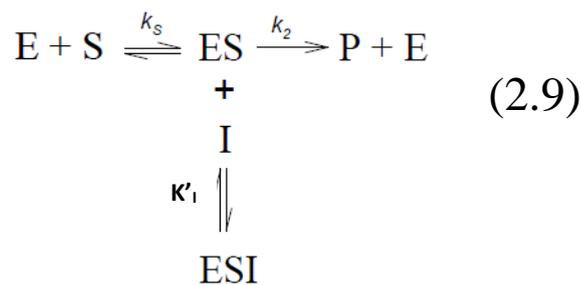
2.2.1 Modelos de Inibição

O produto ou o substrato das reações enzimáticas podem agir como inibidores, quando presentes em concentrações elevadas. As inibições reversíveis podem assumir diferentes tipos.

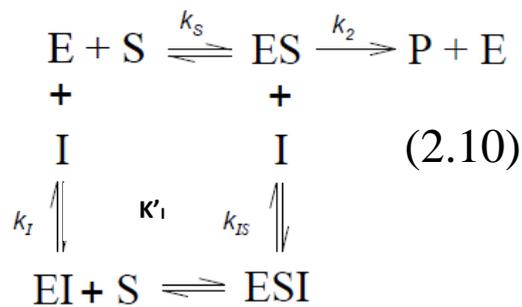
A inibição competitiva ocorre quando o substrato e o inibidor (I) disputam o sítio ativo da enzima, equação 2.8. A formação do complexo enzima inibidor (EI) é uma reação reversível. Essa inibição não afeta a velocidade máxima de reação, porém diminui a afinidade entre o substrato e a enzima. As equações dos modelos de inibição são apresentadas na Tabela 1. O valor de K_m é alterado conforme a concentração do inibidor (SHULER; KARGI, 2002).



Na inibição acompetitiva o inibidor não se liga ao sítio ativo da enzima, mas sim ao complexo enzima substrato, em um local diferente do sítio ativo, equação 2.9. Essa inibição afeta tanto V_{max} e K_m , reduzindo o valor de ambos (VOET, VOET, 2011). As alterações nestes parâmetros da equação de Michaelis–Menten são mostradas na Tabela1.

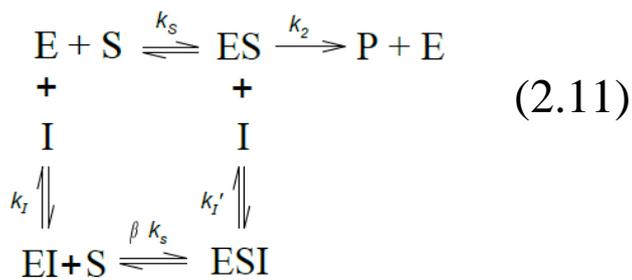


Na inibição não competitiva, o inibidor se liga tanto à enzima livre quanto ao complexo enzima substrato, em um local distinto do sítio ativo, equação 2.10. Ao se complexar com a enzima, o inibidor gera uma distorção da estrutura tridimensional dela, fazendo com que a mesma fique inativa. A velocidade máxima de reação reduz, porém o valor de K_m permanece inalterado (SHULER; KARGI, 2002, VOET, VOET, 2011).



Na inibição mista, assim como na não competitiva, o inibidor se une à enzima livre e ao complexo ES. Esse modelo de inibição pode ser considerado uma mistura de inibição competitiva parcial e inibição não-competitiva, caso β seja maior que 1. A eq. 2.11 mostra a representação esquemática dessa reação. Esse modelo de inibição diminui a velocidade máxima, enquanto o K_m aumenta (VOET, VOET, 2011, SHULER; KARGI, 2002).

A Tabela 1 apresenta os efeitos dos tipos de inibição na equação de velocidade de



Michaelis-Menten, onde K_i é a constante de dissociação do complexo EI e $K'i$ é a constante de dissociação do complexo enzima-substrato-inibidor. K_i é uma medida da afinidade da enzima pelo inibidor e quanto menor for o seu valor, maior a afinidade (MARANGONI, 2003, SHULER; KARGI, 2002).

Tabela 1 Efeito dos tipos de inibição na equação de velocidade de Michaelis-Menten.

Tipo de inibição	Equação de velocidade	K_m aparente	V_{max} aparente
Competitiva	$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$	$K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$	V_{max}
Acompetitiva	$v = \left(\frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}\right) \frac{K_i}{K_i + [S]}$	$\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$	$\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$
Mista	$v = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) [S]}$	$K_m \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$	$\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$
Não-competitiva	$v = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) (K_m + [S])}$	K_m	$\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$

Fonte: adaptada de MARANGONI, 2003.

2.2.2. Cinética da hidrólise de óleo catalisada por lipase

Sendo enzimas solúveis em água, a reação intrínseca da hidrólise de substratos insolúveis (como óleos), catalisada por lipase, tem que ocorrer na interface entre a fase aquosa e a lipídica do substrato.

O primeiro estágio da reação é a adsorção da enzima na superfície hidrofóbica. A enzima permanece na fase aquosa, então a sua ligação ao substrato depende da presença de uma estrutura hidrofóbica na lipase. Segundo Cajal et al, 2000, todas as lipases cujas estruturas foram elucidadas até então tinham em comum uma estrutura, conhecida como dobra α/β hidrolase, e muitas lipases possuíam uma curta estrutura R (mão direita)-helicoidal, que funciona como uma “tampa”. Estando a enzima dispersa na fase aquosa, a tampa permanece fechada e o sítio ativo inacessível. Ao se ligar ao substrato, a hélice se abre e dobra para o interior da enzima, que tem sua estrutura modificada, criando um túnel hidrofóbico por onde o substrato se move para o sítio ativo (OLLIS et al., 1992; NOINVILLE et al., 2002). O sítio ativo de lipases é formado por uma tríade catalítica composta por um resíduo de serina ativado por uma ligação de hidrogênio entre o grupo OH desse resíduo. Um resíduo histidina, por sua vez, faz ligação de hidrogênio com um resíduo aspartato ou glutamato (BLOW, 1990).

A interface é formada quando a concentração do substrato é alta o suficiente para formar agregados micelares ou uma emulsão, como gotas de óleo rodeadas de água, onde se encontra

a enzima. REIS et al, 2008 reportaram que na saturação da interface com lipases ocorrem concentrações “bulk” próximas a $3,5 \times 10^{-5}$ M. Uma vez que a catálise com lipase é área e não volume dependente, uma concentração enzimática acima da saturação não deve ter impacto sobre a bioconversão.

O tamanho da área interfacial entre substrato e água afeta diretamente a velocidade de reação. Isso se dá pois quanto maior a área interfacial, maior é também a área de substrato para a ligação de moléculas e enzimas, com maior número de moléculas de substrato sendo convertidas por minuto no sistema reacional em estudo. Essa área aumenta com a diminuição das gotículas formadas (KIERKELS et al., 1990).

Assim, a agitação é um fator importante para a velocidade observada, pois interfere no tamanho da gota de substrato que se forma. Temperatura é outro fator que modifica a área da interface água/óleo, já que impacta na viscosidade do óleo. Em temperaturas mais altas, o óleo se torna mais fluido, favorecendo o aumento da área superficial das gotículas (ARMAND et al., 1992).

Dependendo das razões mássicas óleo/meio aquoso, a fase contínua pode ser óleo ou água (NOINVILLE et al., 2002), o que afeta diretamente as velocidades observadas para a reação e deve assim refletir no modelo cinético. O tamanho das gotas é também um parâmetro importante em qualquer modelo detalhado de reação (AL-ZUHAIR, et al., 2013; VOLL et al., 2012), e deve ser considerado diretamente num modelo fenomenológico, ou então seu efeito deve ser embutido de alguma maneira nos parâmetros de um modelo simplificado. Depois da adsorção na interface, uma modificação estrutural ocorre na enzima para conduzir a molécula de óleo (triacilglicerol) até o sítio ativo (VOLL et al., 2012). Vale a pena ressaltar que a reação de hidrólise requer água como um segundo substrato.

É consenso na literatura que a reação intrínseca segue um mecanismo bi-bi (NOINVILLE et al., 2002; McCLEMENTS et al., 2005). Contudo, quando um dos reagentes está em excesso, a velocidade aparente da reação depende somente da concentração do reagente limitante (NOINVILLE et al., 2002). Um grande número de moléculas de água se localiza na cavidade interna da enzima, que serão liberadas para reagir com o substrato durante a hidrólise (REIS et al., 2008).

Além disso, a água usualmente está em excesso na fase “bulk” das reações de hidrólise e, assim, se a reposição das moléculas de água na cavidade interna não for a etapa limitante, é razoável se assumir que água está em excesso na reação de hidrólise. Nesse caso, um modelo simples para um substrato, como o modelo de Michaelis-Menten, deverá ser capaz de

representar os fenômenos essenciais que ocorrem no mecanismo bi-bi. Essa abordagem foi utilizada com sucesso por CORRADINI et al, 2019, para modelar a hidrólise de óleo de soja catalisada por lipase presente no extrato sólido de mamona.

2.3 Lipase da semente de mamona

A semente de mamona é composta em 50% por óleo de rícino, que possui alta viscosidade e estabilidade em temperatura e pressão abaixo de seu ponto de resfriamento (MUTO, BEEVERS, H., 1974). Ela possui duas lipases ativas, sendo que a que opera com atividade máxima em pH 4,5 é a que apresenta maior atividade e está ativa na semente em seu estado dormente, mantendo alta atividade até os dois primeiros dias de germinação. A outra lipase exibe alta atividade do terceiro ao quinto dia da germinação, apresentando maior atividade em pH 9. A atividade máxima da segunda lipase, entretanto, é mais baixa que a da primeira (lipase ácida) (AVELAR, 2013; GODOY, 2009).

Eastmond e colaboradores (2004) estudaram a estrutura primária da lipase ácida da mamona, através do isolamento da enzima, clonagem de seu DNA e codificação da sequência de aminoácidos, apresentada na Figura 3. De acordo com a literatura, esse biocatalisador possui 525 aminoácidos e massa molecular de 59,6 KDa. Foi confirmada também a presença da tríade catalítica (Ser-340, Asp-404 e His-497), e da estrutura de dobra α/β hidrolase, comum às lipases.

Figura 3 Sequência de aminoácidos da lipase ácida da semente de mamona, a tríade catalítica (S, D, H) está destacado em negrito

```
MDDAGKITSTSHLIVSPDEGTFLDLFKHIVLSDLGSGAKFFRASDQRPATAAAYSRWPVSVFICKILQL 70
FQMPAAMLGHLTDFFLLNFYYQNHGFLGILRNIFLIRLKI PKRGEADFISTIGYLD SRMDLHGTPMVSHQA 140
DEVISNADNP SLKEGHNSKIKGALGNRSLMDLCIMASKLAYENTKVVERVVAEHWKMHFVADYGGMNYFQ 210
DARNTHAFI FCDKPKDANLIVISFRGTGPFSIPNWCTDFDFSLVGLGDAGSVHVGFLEAMGLGHRNSISS 280
FETSINTKSPGSITELRKESEMAPDHLVWAYDGVYFLAASTLKGLLDHKNAKFVVTGHSSLGGALAILFT 350
CILEIQQETEVLDRLLNVYTFGQPRIGNYNLGYFMQNRNLNFPERRYFRVVYCNDMVPRVPFDDVFFTFEH 420
FGTCIYYDSRFFGYFTKEEPSRNPFGIENAI SAHITAWWELWRSFILNHVYGAEYKETWESRMFRILGLF 490
LPGVAAHSPVNYVNSVRLGRELAIPMLSLKMMMAQGY 526
```

Fonte: Adaptado de EASTMOND et al., 2004

Outra proteína presente na semente de mamona é a toxina ricina. Essa toxina tem tamanho 62-66 kDa e é formada por duas cadeias polipeptídica de aproximadamente 32 kDa e 34 kDa, respectivamente, que se unem através de ligações dissulfeto (MENEGUELLI DE SOUZA et al, 2018). Segundo Godoy et al., 2009, o mecanismo de atuação da ricina consiste na inibição da síntese de proteínas em células de mamíferos e sua quantidade letal para humanos

é de 1 – 10 µg/kg. A presença da ricina implica em risco na utilização do material produzido a partir da semente de mamona, impedindo sua aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

A lipase da mamona apresenta bons desempenhos na reação de hidrólise, como foi apresentado por Avelar (2013) e Santos (2013). Os testes de esterificação não foram satisfatórios devido a natural complexidade da reação interfacial com a lipase ácida da semente de mamona (BRESSANI, 2014).

Corradini et al, 2019 reportaram o único estudo cinético na literatura da catálise pela lipase de mamona para a hidrólise do óleo de soja, utilizando a enzima na forma de extrato sólido da semente. Nesse caso, além da natural complexidade da reação interfacial, os autores tiveram que lidar com os efeitos difusivos que ocorrem pela necessidade de travessia da camada estagnada em torno da semente sólida, atrasando o encontro entre enzima e substrato. Apesar disso, eles conseguiram representar essa reação com um modelo simples de Michaelis –Menten, onde o efeito do aumento das gotas de óleo, e a conseqüente redução da área esperada para essas concentrações, pode ser modelado como se fosse uma inibição por excesso de substrato. Os valores de parâmetros obtidos foram $V_{M\acute{a}x}/U_{hid}$ ($7,77 \times 10^{-4} \pm 2,88 \times 10^{-4}$ mmol.Uhid⁻¹.min⁻¹), K_m ($192,63 \pm 76,5$ mM) e K_s ($1007,0 \pm 190,9$ mM), a 37 °C, pH 4,5, tampão acetato de sódio 100mM. Evidentemente, esses devem ser parâmetros aparentes da reação, pois os intrínsecos só poderão ser estimados com a enzima na forma solúvel.

2.4 Extração e purificação de biomoléculas

Os processos de biosseparação são fundamentais para a biotecnologia moderna, sendo uma das principais razões para o elevado custo de fabricação de bioprodutos (AZMIR, 2013). O grande desafio da biosseparação é o processamento de partículas frágeis como proteínas biologicamente ativas, polissacarídeos, nucleotídeos, vírus e células viáveis inteiras que requerem condições de processamento suaves e economicamente viáveis (LIGHTFOOT, 2004).

Além da fragilidade, outras dificuldades enfrentadas na separação de biomateriais são a semelhança entre as espécies presentes no meio e o alto grau de pureza exigido (PRZYBYCIE, 2004). Normalmente, métodos de separação eficientes dependem de irregularidades do sistema e necessitam de um grande número de etapas em série. Outro fator que aumenta o número de etapas da biosseparação é a produção de biomoléculas diluídas ou que se tornam diluídas em algum momento do processo. A cada etapa de separação, há perda de atividade catalítica. Logo,

é importante que a extração e purificação do processo se realize em um número mínimo de passos, a fim de preservar a integridade do produto e o menor custo de fabricação (LIGHTFOOT, 2004).

A extração é a primeira etapa para a obtenção da biomolécula de interesse. Considerando isso, para este trabalho em específico, um extrato bruto com a enzima ácida da semente de mamona será obtido e solubilizado em fase aquosa. Um artifício de extração da lipase ácida da mamona, já aplicado por diversos autores, é a extração de proteínas em tampão. Nesse método, os sais presentes no tampão influenciam na solubilidade das proteínas, aumentando-a ou diminuindo-a. Em baixas concentrações, os sais aumentam a solubilidade de várias proteínas, efeito chamado de “salting-in”. Esse aumento é promovido pela alteração na tendência à ionização dos grupos R dissociáveis da proteína. Para altas concentrações de sais, a solubilidade das proteínas é reduzida, efeito chamado de “salting-out”. Os íons do sal são hidratados, reduzindo a disponibilidade de moléculas de águas que rodeiam as regiões hidrofóbicas da superfície da proteína, causando sua precipitação. A força iônica do sal tem a capacidade de influenciar a solubilidade das proteínas, que depende tanto da sua concentração, quanto do número de cargas elétricas dos cátions e ânions que formam o sal (LEHNINGER, 1976).

Tabela 2 Extração de lipase da semente de mamona diferentes tampões.

Solvente	pH	t(h)	mLsolvente /gsemente	Referência
Tampão de fosfato (0,1 M, cisteína 0,05 M e EDTA 0,01 M)	7	-	-	ORY R. L. et al., 1962
Tampão de fosfato (0,1 M, cisteína 0,05 M e EDTA 0,01 M)	7,8	-	-	ORY R. L. et al., 1969
Tampão Tricine-NaOH (150 mM 0,4 M sacarose, 1 M EDTA, 10 M KCl, 1 M MgCl₂, 2 mM DTT)	7,5	-	5	FUCHS C. et al., 1996
Solução de sacarose 0,2 M	-	0,4	-	EASTEDMOND P. J. et al., 2004
Tampão Tri-HCl (165 mM com 0,4 M sacarose, 10 mM kCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ e 2 Mm DTT)	7,7	-	-	Er-ZHENG S. et al., 2010
Tampão citrato 0,05M	4 e 5			
Tampão citrato - fosfato 0,05M	4 e 5			
Tampão fosfato 0,05M	6 e 7	12	10	SILVA F. A. et al., 2015
Carb.-Bicarbonato 0,05M	9 e 10			

Há vários relatos de extração e purificação da lipase de mamona na literatura. A Tabela 2 lista as condições de extração de alguns desses estudos. Observa-se que os solventes apresentam baixa concentração de sais e que o pH mais frequente nas extrações está em torno

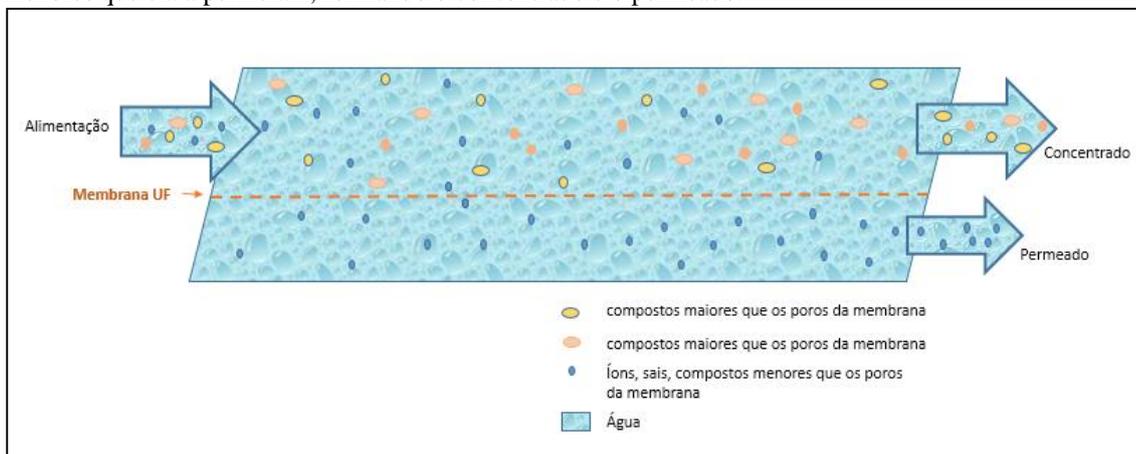
de 7. Também nota-se que há poucas informações sobre o tempo de extração e proporção entre a massa de semente e tampão utilizado.

Visando obter um produto com maior atividade na solução específica, após a extração da enzima é indispensável concentrá-la. Para qualquer processo de purificação de uma proteína é fundamental escolher um caminho com o menor número de passos, além de ser imperativo conhecer as propriedades físico-químicas do produto e das impurezas pois, como dito anteriormente, a separação se dá pelas diferenças de propriedades. Existem diversas técnicas de purificação aplicáveis na recuperação de biocompostos, tais como a precipitação induzida por pH, sais ou álcoois; cromatografia; sistemas de membrana líquida; adsorção em suportes; centrifugação por gradiente de densidade; eletroforese, entre outros (LIGHTFOOT, 2004).

A cromatografia de leito fixo - apesar do seu alto custo, baixa taxa de transferência e complexidade de aumento de escala - vem sendo utilizada extensivamente na purificação de proteínas, pois oferece alta resolução nos processos de separação. Sua aplicação é aconselhável em produtos de custo elevado, presentes em soluções diluídas e impuras, para realizar a separação de elementos que são intimamente relacionados. Já membranas de filtração são uma alternativa para compostos cuja separação é mais fácil, podendo ser utilizadas para concentrar a solução quando se deseja apenas reter o composto de interesse. As membranas são bem mais baratas e por isso vêm substituindo a cromatografia em vários processos (PRZYBYCIEN et al. 2004).

O sistema de ultrafiltração consiste em uma membrana de material orgânico ou inorgânico que permite a passagem seletiva de alguns compostos conforme seu tamanho, característica ou formato e impede a passagem de outros. A Figura 4 mostra o funcionamento de uma membrana de ultrafiltração (MIERZWA, 2005).

Figura 4 Sistema de ultrafiltração: o fluxo de alimentação passa transversalmente a membrana e as partículas menores que ela a permeiam, formando o concentrado e o permeado.



A ultrafiltração separa a solução alimentada em duas frações distintas (Figura 4); o permeado, que é composto por elementos de tamanho menor que o dos poros da membrana e conseguem atravessá-la; e o concentrado, constituído pelas partículas retidas pela membrana e que são carregadas pelo fluxo (ERIKSEN, 1985). Esse tipo de filtração é utilizado para selecionar compostos por tamanho e concentrar o produto de interesse.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1 Sementes e óleos vegetais

Sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) cultivar AL Guarany 2002 foram adquiridas da BR SEEDS LTDA (Araçatuba – SP). O óleo de soja refinado (Liza) foi adquirido no comércio local.

3.1.2 Reagentes consumíveis

Albumina sérica bovina (BSA), *blue Brilliant G-250 Coomassie* e tributirina foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Dodecil sulfato de sódio (SDS), tetrametiletenodiamina (TEMED), tris(hidroximetil) aminometano hidrocloreto (TRIS-HCl) foram adquiridos da Hexapur (Califórnia, EUA). Acrilamida e bisacrilamida foram adquiridas da Ludwig Biotec (Rio Grande do Sul, Brasil). Biftalato de potássio da Quimibrás (Rio de Janeiro, RJ). Triton-X 100 foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, RJ). Acetato de Sódio, acetona, ácido acético, ácido cítrico, carbonato de sódio, etanol hidratado, etanol anidro, éter etílico, fenolftaleína, fosfato de sódio bibásico dodecahidratado, fosfato de sódio monobásico anidro, goma arábica (resina natural composta de polissacarídeos e glicoproteínas), sulfato de amônio, hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). As membranas de celulose com diâmetro de corte de 14 kDa usadas nas diálises foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A resina Streamline SP XL e o marcador molecular Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit foram adquiridos da GE Healthcare (Inglaterra).

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos Analíticos

3.2.1.1 Atividade da lipase ácida de mamona: hidrólise de tributirina a pH 4,5

A atividade enzimática foi determinada medindo-se a velocidade inicial de produção de ácido butanoico, que ocorre durante a hidrólise de tributirina, segundo a metodologia de Beisson et al. (2000), com algumas adaptações. A hidrólise foi realizada em um reator encamisado de 50 mL, conectado a um banho termostático, para manter a temperatura de 37

°C. A reação foi executada sob agitação mecânica de 500 rpm. O meio reacional foi composto de 14 mL de água destilada, 5 mL de tampão acetato 100 mM, pH 4,5 e 1 mL de tributirina. Para que se atingisse a temperatura de reação, o meio foi agitado por 2 minutos antes de adicionar a mistura enzimática (100 µL de solução da lipase livre de mamona ou 0,1g ESM). Após a adição da enzima, uma solução básica de hidróxido de potássio 20 mM foi acrescentada à reação, através de um pHstato (pHstat Tritrino 718, Metrohm - Suíça), para manter o pH do meio reacional em 4,5, acompanhando-se a liberação de ácido butanoico durante 5 minutos. A quantificação da produção de ácido butanoico produzido na reação em função do tempo foi feita medindo-se o volume de KOH adicionado à reação, durante sua fase linear (até 5% de conversão). A velocidade inicial foi então calculada como a tangente da reta obtida. A atividade enzimática foi calculada dividindo-se a velocidade inicial pela concentração de enzima no meio, obtendo-se assim a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido butanoico por minuto, por volume de solução de enzima livre ou massa de ESM, nas condições experimentais da reação (U_{TBU}). Segue a equação utilizada para o cálculo.

$$\text{Atividade} \left(\frac{U_{TBU}}{\text{mL ou g}} \right) = \frac{(\text{mL KOH/min}) \times M \times 1.000}{E} \quad (3.1)$$

Onde:

M: Concentração molar da solução de KOH (M);

E: Quantidade de enzima utilizada no ensaio (mL para enzima solúvel e g para extrato bruto).

3.2.1.2 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas extraída com tampão foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976). É um método colorimétrico, que se baseia na ligação do corante *Coomassie Blue Brilliant G-250* à proteína, provocando a mudança da coloração da solução de castanho escuro para azul. Utilizou-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão para a construção da curva de calibração.

Para amostras que continham Triton X-100, o método do ácido bicinonínico (BCA) segundo Smith (1982) foi utilizado. 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, 0,05 mL de amostra foi adicionada à 1 mL da mistura e incubado a 37°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 562 nm, utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão para a construção da curva de calibração.

3.2.1.3 Diálise

A solução contendo a lipase de mamona extraída do ESM e o tensoativo Triton X-100 foi dialisada em membrana de acetato de celulose (Sigma-Aldrich, St. Louis-EUA) em água ultrapura gelada (4 °C) com trocas de água a cada 1 horas, nas primeiras 3 horas. Após as trocas de água, a diálise prosseguiu até completar 16h.

3.2.2 Extração e purificação da lipase ácida de mamona

3.2.2.1 Preparo do extrato bruto de mamona

O extrato sólido da mamona (ESM) foi obtido segundo a metodologia descrita por Pierozan et al., (2009), com modificações. A semente de mamona não germinada foi descascada e triturada na presença de acetona a 4° C por 2 minutos. Em seguida, o volume foi completado até chegar na proporção semente/acetona de 1:5 (m/v). A mistura (semente e acetona) para extração do óleo presente na semente foi mantida em agitação vigorosa por 4 horas a 4 °C. Filtrou-se a solução a vácuo e a massa de mamona foi seca por 24h em temperatura ambiente, a fim de evaporar a acetona presente no ESM. Posteriormente, a massa de semente foi peneirada em malha 0,85 mm.

3.2.2.2 Extração de lipase do ESM em diferentes pHs

A extração foi realizada seguindo a metodologia descrita por Silva et al., (2015), empregando os tampões com força iônica de 50 mM: citrato de sódio pH 4, fosfato de sódio pHs 6 e 7 e carbonato-bicarbonato de sódio pH 10. Em um frasco plástico de 50 mL, 4 g de ESM foram suspensos em 40 mL de tampão. A suspensão foi mantida sob agitação constante em shaker orbital por 4 horas a 25°C, e então centrifugada a 4 °C e 10000 rpm por 7 min. O sobrenadante foi filtrado a vácuo e reservado, o ESM foi descartado. A lipase de mamona extraída para a fase aquosa é denominada Extrato Bruto de Lipase de Mamona (EBLB).

3.2.2.3 Extração de lipase do ESM utilizando tensoativo

A extração foi realizada em tampões acetato do sódio pH 4,5 com força iônica de 50 mM e adição do tensoativo Triton X-100 nas concentrações de 0,1 %, 0,5 %, 1% e 2%, (V/V) triton/tampão. Em um frasco plástico de 50 mL, 2 g de ESM foram suspensos em 20 mL da solução de extração. A suspensão foi mantida sob agitação constante em shaker orbital por 30 minutos a 4°C, e então centrifugada a 4 °C e 10000 rpm por 7 min. O sobrenadante foi filtrado a vácuo e reservado, o ESM foi descartado. Foram medidas as atividades enzimáticas e proteínas totais da extração. Ao final da extração, realizou-se a diálise do extrato bruto para a remoção do tensoativo.

3.2.2.4 Extração sequencial lipase do ESM

A extração foi realizada seguindo a metodologia descrita por Silva et al., (2015), empregando os tampões com força iônica de 50 mM: fosfato de sódio pHs 6, 7 e Carbonato de sódio pH 10, na proporção de 1:10 (M/V) ESM/tampão. O ESM foi incubado inicialmente em tampão fosfato pH 6, sob agitação constante a 25°C por 1 hora, para remoção de proteínas indesejadas. Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o os sólidos foram ressuspensos em diferentes tampões fosfato pH 7 e carbonato pH 10 e mantidos sob agitação por 1 hora a 25°C. O volume de tampão utilizado na segunda extração levou em consideração a umidade presente na massa de sólidos, mantendo a proporção de extração 1:10 M/V. Depois de centrifugado, mediu-se a atividade enzimática do EBLM do ESM após extração. Do EBLM também mediu-se as proteínas totais extraídas.

3.2.2.5 Extração sequencial de lipase do ESM com tensoativo

A extração foi realizada conforme descrito no item 3.2.2.4 extração sequencial lipase do ESM, a ressuspensão do ESM na segunda extração, depois da extração em pH 6, utilizou-se o tampão fosfato de sódio pH 7, força iônica de 50 mM e triton X-100 0,5% (M/V). A segunda etapa foi realizada em 15 minutos, uma vez que a presença do tensoativo pode causar a inativação da enzima de interesse. Ao final da extração, realizou-se a diálise do extrato bruto para a remoção do tensoativo. Mediu-se a atividade enzimática e proteínas totais antes e após a diálise do EBLM e a atividade enzimática do ESM, após extração.

3.2.2.6 Extração de lipase na semente de mamona dormente não desengurdorada:

A extração foi feita segundo a metodologia de Fuchs et al. (1996), com algumas adaptações. Em um liquidificador, a semente de mamona foi triturada por 2 minutos, 20 gramas em 100 mL de tampão, sendo testados tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7 e tampão carbonato de sódio 50 mM a pH 10. A solução de extração e a semente ficaram em contato por 15 minutos sob agitação. O procedimento foi realizado a 4 °C.

A semente foi filtrada em filtro a vácuo em tecido de algodão, após a filtração o tampão de extração foi centrifugado a 10000 g, por 10 min, em temperatura de 4 °C. A camada de gordura formada após a centrifugação foi removida e ressuspensa em 25 mL de tampão de extração. O tampão utilizado na extração após remoção da camada de gordura é denominado fase aquosa da extração. A camada de óleo que foi ressuspensa foi centrifugada (10000 g, 10 min e temperatura de 4°C), para remover proteínas solúveis e precipitados.

Após segunda centrifugação a camada de gordura formada foi novamente removida e ressuspensa em 5mL de tampão de extração. Foi então adicionado 20 mL de dietil éter, para realizar uma extração líquido-líquido e remoção do óleo presente. A mistura foi centrifugada a 2000 g, por 3 min e em temperatura de 4 °C. Após centrifugação duas camadas se formaram, e removeu-se a camada superior de éter que contém o óleo. A extração líquido-líquido foi repetida mais uma vez e o restante de éter foi removido em um fluxo de nitrogênio, onde obteve-se um fase aquosa com a lipase que estava presente no óleo extraído da semente denominada extrato da camada de óleo.

Mediu-se a atividade enzimática e proteínas totais da fase aquosa da extração e do extrato da camada de óleo

3.2.2.7 Ultrafiltração

Foi realizada a ultrafiltração do EBLM, em membrana de polipropileno Pelicon (Millipore) com corte de 30 KDa. O sistema de ultrafiltração é composto por dois reservatórios, uma bomba peristáltica e a membrana de filtração. Adicionou-se o EBLM no reservatório 1, esse extrato enzimático foi bombeado (20 mL/min) para a membrana de ultrafiltração. O fluxo de alimentação passou transversalmente à membrana, o fluído que atravessou a membrana foi denominado permeado e coletado no reservatório 2, o material que não conseguiu permear a membrana retorna para o reservatório 1 e é chamado de concentrado. O processo foi mantido até o volume inicial ser reduzido 10 vezes e formar o Concentrado de Lipase Livre de Mamona

(LLM). O reservatório 1 contendo o extrato bruto da lipase de mamona foi mantido em banho de gelo para evitar a degradação térmica da enzima de interesse.

3.2.3 Estabilidade enzimática

3.2.3.1 Estabilidade térmica da lipase de mamona solúvel

Em microtubos de 2 mL, 100 µL do concentrado da lipase de mamona solúvel (7,89 mg/mL) foram incubados em 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5. Após a homogeneização, os tubos foram incubados a 25, 30 e 37°C. Amostras foram retiradas após 15 min, 30 min, 1,5 h, 3h, 4h, 6h, 12h e 24h e a atividade lipolítica foi determinada pelo método de hidrólise da tributirina.

3.2.3.2 Estabilidade em pH do extrato sólido de mamona

Em microtubos de 2 mL, foram suspensos 100 mg do extrato sólido de mamona em 1 mL dos tampões citrato de sódio pH 4, fosfato de sódio pHs 6 e 7, carbonato-bicarbonato de sódio pH 10, com força iônica de 50 mM. Após a homogeneização, os tubos foram mantidos a 25°C. Amostras foram retiradas após 30 min, 1h, 2h, 3h e 4h e a atividade lipolítica determinada pelo método da hidrólise da tributirina.

3.2.3.3 Estabilidade em pH do concentrado de lipase de mamona solúvel

Em microtubos de 2 mL, foram suspensos 100 µL do extrato sólido de mamona em 1 mL dos tampões acetato de sódio pH 4 e 4,5 fosfato de sódio pHs 6 e 7, carbonato-bicarbonato de sódio pH 9 e 10, com força iônica de 50 mM. Após a homogeneização, os tubos foram mantidos a 25°C. Amostras foram retiradas após 4h e a atividade lipolítica determinada pelo método de hidrólise da tributirina.

3.2.3.4 Estabilidade na presença de tensoativo do extrato sólido de mamona

Em microtubos de 2 mL, foram suspensos 100 mg do concentrado da lipase de mamona solúvel (7,89 mg/mL) em 1 mL de solução tampões acetato de sódio 50 mM pH 4,5, contendo os tensoativo Triton X-100 (0,5%, 1%, 2% e 3%, m/v) ou Dodecil sulfato de sódio (SDS) (0,1%, v/v). Após a homogeneização, os tubos foram mantidos a 4°C e coletadas amostras no tempo 0 min, 15 min e 30 min e a atividade lipolítica foi medida pelo método de hidrólise da tributirina.

3.2.4 Caracterização cinética da enzima:

O substrato escolhido para os experimentos cinéticos foi o óleo de soja, devido a sua grande disponibilidade e por ser a matéria prima mais utilizada na produção de biodiesel no Brasil (MME, 2018). Em todos os experimentos foram tomadas as velocidades iniciais de hidrólise do óleo de soja, catalisada pela lipase de mamona solúvel concentrada. Para a realização dos ensaios com LLM, foi necessário fazer a extração e concentração com o processo foi realizado mais de um vez e foram observadas algumas diferenças no valor de U_{TBU}/mL de LLM obtido, para garantir a reprodutibilidade dos resultados. O valor de U_{TBU} fornecido à reação foi informado, e não o volume ou quantidade de proteínas totais de LLM utilizado nos teste (valores especificados em cada procedimento). O acompanhamento da evolução da reação foi feito pela variação do índice de acidez do meio reacional. Foram realizadas coletas de alíquotas de 1 mL da mistura reacional em intervalos regulares. As amostras foram pesadas e transferidas para um béquer, contendo 10 mL de etanol comercial, com a finalidade de inativar a enzima e solubilizar os ácidos graxos livres (AGL). O volume do béquer foi titulado com uma solução padronizada de hidróxido de potássio 20 mM na presença de indicador fenolftaleína. A concentração de AGL produzida pela hidrólise foi calculada pela equação 3.2, e o percentual da hidrólise foi calculada seguindo a Equação 3.3 adaptada de Rooney; Weatherley (2001).

$$\text{Concentração } \left(\frac{mM}{L}\right) = \frac{V(\text{mL}) \times M (\text{mol/L})}{V_{\text{amostra}}} \quad (3.2)$$

$$\% \text{ hidrólise} = \frac{V(\text{mL}) \times M \left(\frac{\text{mol}}{L}\right)}{m \times f} \times \frac{MM}{3} \times 100 \quad (3.3)$$

Onde:

V: Volume de KOH (mL) gasto na titulação;

M: Concentração da solução de KOH (mol/L);

MM: Massa molar do óleo vegetal (g/mol);

m: massa da amostra (g) coletada;

f: Fração de óleo no início da reação (m de óleo/massa total do sistema).

3.2.4.1 Efeito da concentração enzimática na hidrólise de óleo de soja

Em um reator de 200 mL com 5 cm de diâmetro interno, foram adicionados 10 g de óleo de soja, 90 mL de fase aquosa e o tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5. Considerando a

umidade presente na massa de sólidos adicionada ao meio, foram fornecidas 16, 22,44, 88, 132 e 175 U_{TBU} totais. A reação se processou a 37°C, 1000 rpm por 15 minutos. Durante o progresso da reação, o índice de acidez do meio foi acompanhado. Antes da adição do concentrado de enzima, o óleo e o tampão foram agitados por 2 minutos para atingir a temperatura de reação.

3.2.4.2 Efeito da agitação sobre a difusão da enzima na hidrólise de óleo de soja

Em um reator de 200 mL com diâmetro de 5 cm, foram testados dois volumes, 50 e 100 mL de meio reacional. O meio reacional era composto por 10% de óleo de soja, os outros 90% (M/V óleo/tampão) de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, subtraído o volume de LLM. Para este ensaio foram fornecidos 16 U_{TBU} no volume de 50 mL e o dobro de U_{TBU} para o volume de 100 mL. Dois impelidores foram testados, ambos com pás de comprimento de 3,5 cm, sendo um de 1 pá e o outro de 3 pás. Antes da adição do concentrado de enzima, o óleo e o tampão foram agitados por 2 minutos para atingir a temperatura de reação de 37°C. Foram testadas as agitações de 750 rpm, 1000 rpm e 1250 rpm.

3.2.4.3 Efeito concentração de substrato na hidrólise de óleo de soja

A reação se processou a 37 °C, 1000 rpm, com o impelidor de 3 pás em um reator de 200 mL. A fase aquosa de volume de 40 mL composta por tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 e LLM (36 U_{TBU}) foi mantida constante em todas diferentes concentrações de óleo testadas. Antes da adição do concentrado de enzima, o óleo e o tampão foram misturados por 2 minutos para atingir a temperatura de reação. Foram realizados ensaios nas concentrações de óleo 22,88; 57,21; 114,42; 228,83; 286,04; 343,25; 400,46; 457,67; 572,08 (g/L) ou 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% e 50% (m/v) de óleo no meio reacional.

3.2.4.3 Efeito de pH e temperatura na hidrólise de tributirina

Os ensaios de influência da temperatura e do pH na atividade lipolítica foram determinadas pela hidrólise da tributirina. Para determinar as faixas de pH e temperatura a serem testadas, observou-se desempenho do ESM em testes de temperatura e pH realizados por Santos et al. (2013) e somente as análises em condições onde a lipase de mamona teve bom desempenho foram realizadas. Foram testados os pH de 4, 4,5 e 5, com tampão acetato de sódio 100 mM. Nos testes de temperatura, a temperatura foi variada de 30 °C a 50 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Extração em fase aquosa e concentração da lipase de mamona

A extração da enzima para a fase aquosa permite sua concentração, purificação e imobilização de forma controlada, com possível melhoria de suas propriedades. A técnica de extração empregada neste trabalho é de fácil aplicação e baixo custo, visando obter um procedimento que possa ser reproduzido em grande escala e seja economicamente viável.

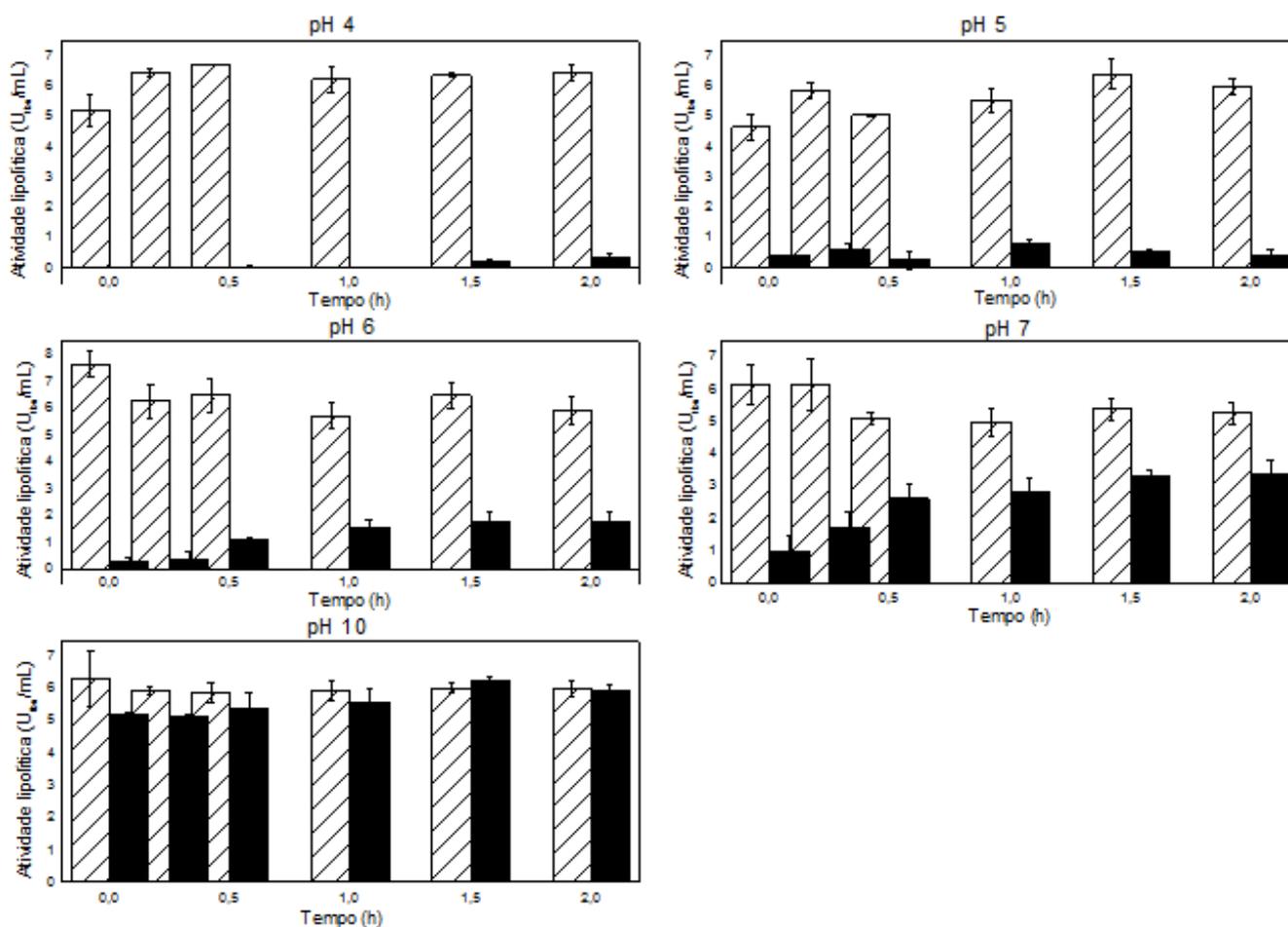
4.1.1 Extração em fase aquosa em diferentes pHs

Foram realizados, inicialmente, experimentos de extração da lipase da semente dormente de mamona em cinco condições: pH 4,0 (tampão acetato), pH 5 (tampão acetato) pHs 6 e 7 (tampão fosfato) e pH 10 (tampão carbonato-bicarbonato), retirando-se amostras ao longo de duas horas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.1. Observou-se, após uma hora, um pequeno aumento na atividade enzimática extraída em todos os pHs testados, não se justificando a extração por um tempo maior, exceto para o pH 4. A atividade do sobrenadante (enzima livre) nesse pH foi muito baixa, por isso foi desconsiderado na determinação do tempo de extração. Foi estabelecido, então, para ensaios posteriores, o tempo de extração de 1 hora.

Os resultados mostrados na Fig.4.1 mostram extração desprezível em pH 4 e pH 5, obtendo-se na fase líquida apenas 5% da atividade inicial medida na semente em pH 4 e 7 % em pH 5. A diminuição do pH resulta na protonação parcial dos resíduos glutâmico e aspártico presentes na proteína, sem alteração no estado iônico carregado dos resíduos aminados, sendo assim esperada a redução da hidrofiliabilidade da enzima, com conseqüente queda na extração em fase aquosa.

O aumento do pH leva à maior solubilização da enzima. A pH 6 foi extraído para o sobrenadante 30% da atividade e, a pH 7, foi extraído 63%. A extração máxima de 98% da atividade é alcançada em pH 10. Os resultados obtidos para o efeito do pH na extração dessa lipase confirmam os observados anteriormente em estudo preliminar realizado por Silva e colaboradores em 2015.

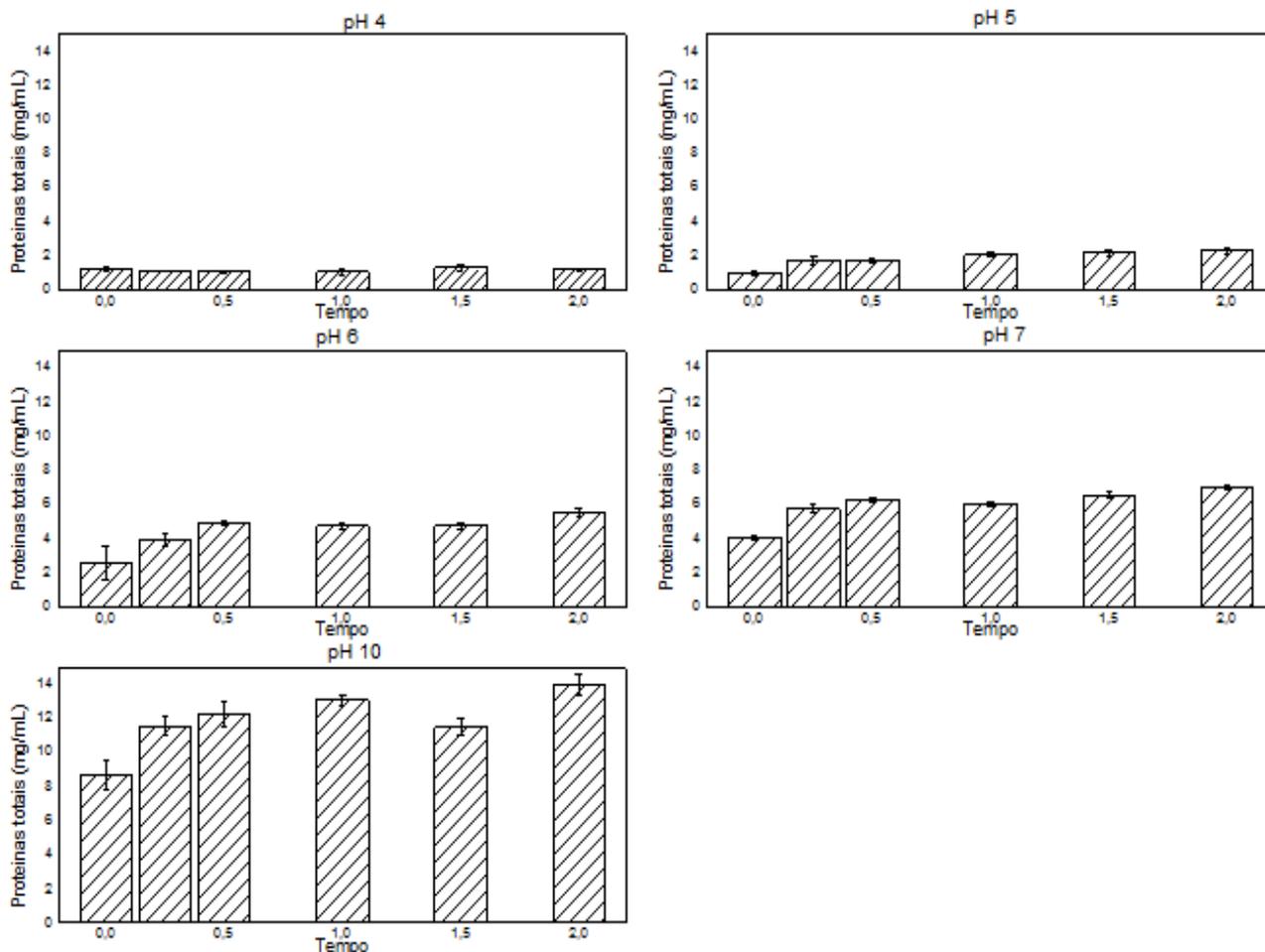
Figura 4.1 Atividade enzimática (UTBU/mL) em função do tempo(h), na extração de lipase ácida do extrato sólido de mamona em tampão 50 mM, a 25 graus, em diferentes pHs. \square = Atividade total (ESM e fase aquosa) \blacksquare = Atividade em fase aquosa.



A Figura 4.2 apresenta valores de proteínas totais extraídas ao longo do ensaio. Com o aumento do pH do tampão de extração, também se observa o aumento da concentração das proteínas totais extraídas. Na Figura 4.3, se apresentam os valores calculados para a atividade específica da enzima extraída (solúvel) em função do tempo e a diferentes pHs.

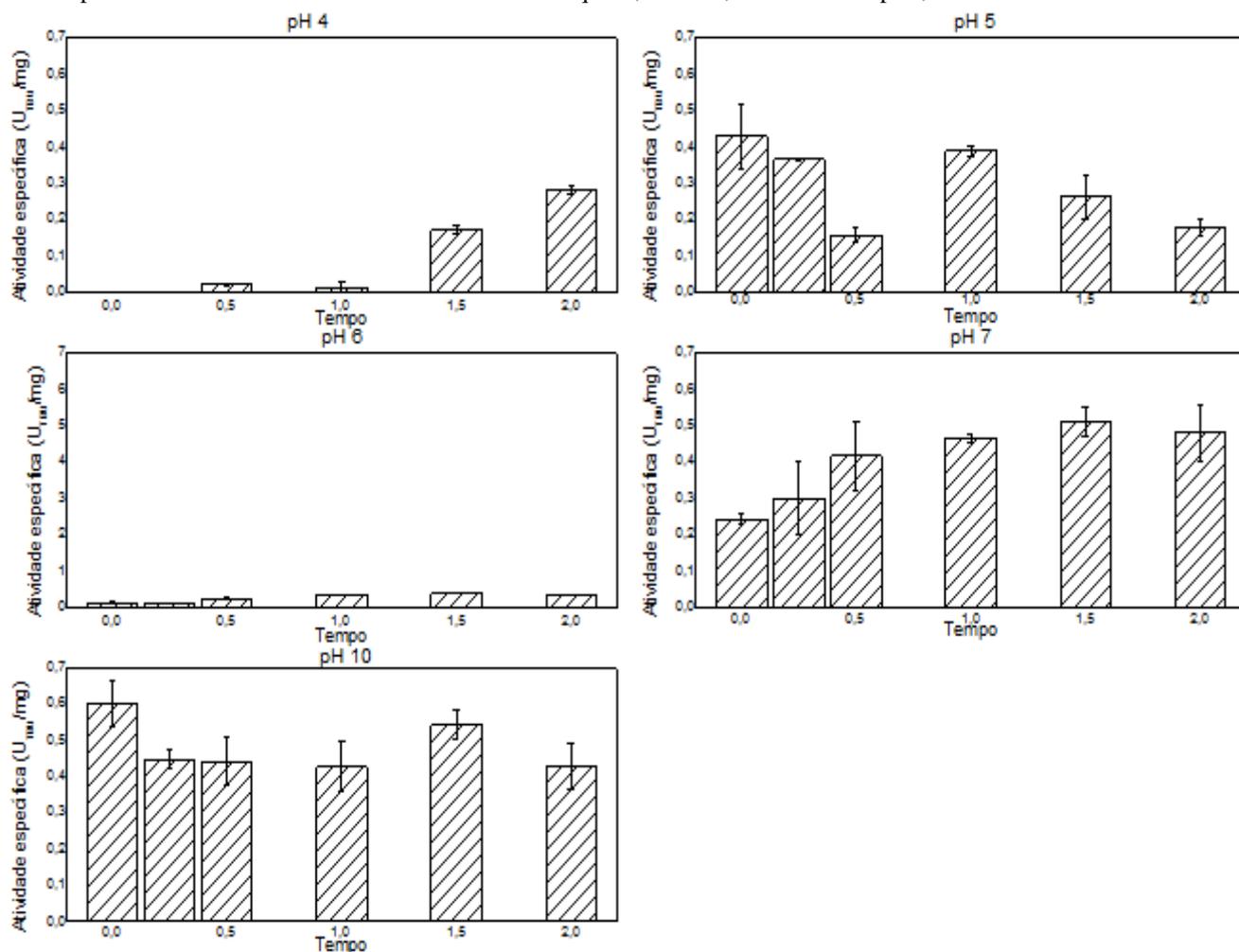
A tendência observada na Figura 4.2 de maior solubilização das proteínas com o aumento do pH, como dito anteriormente, pode ser explicada pela desprotonação das cadeias laterais das proteínas e consequente presença de grupos carregados, tornando-as mais polares e solúveis no tampão. Os resultados obtidos confirmam que o tempo de uma hora é suficiente para extração em todas as condições.

Figura 4.2 Concentração de proteínas totais (mg/mL) ao longo do tempo (h) no sobrenadante centrifugado, após extração de proteínas do extrato sólido de mamona em fase aquosa, a 25 graus, em diferentes pHs, 50 mM.



Os resultados mostrados na Figura 4.3 confirmam também os resultados de seletividade observados no trabalho preliminar de Silva et al., 2015, que indicam que entre pHs de mais alta extração, a menor atividade específica no sobrenadante é observada a pH 6 (0,33 $U_{TBU}/mg_{prot.}$), obtendo-se 0,48 $U_{TBU}/mg_{prot.}$, a pH 7, e 0,43 $U_{TBU}/mg_{prot.}$, a pH 10. Apesar da alta atividade extraída em pH 10, a seletividade próxima da seletividade apresentada em pH 7 e atividade específica ainda é baixa nestes dois pHs, o que pode ser atribuído ao fato de que nesses pHs muitas proteínas que não são de interesse também foram extraídas.

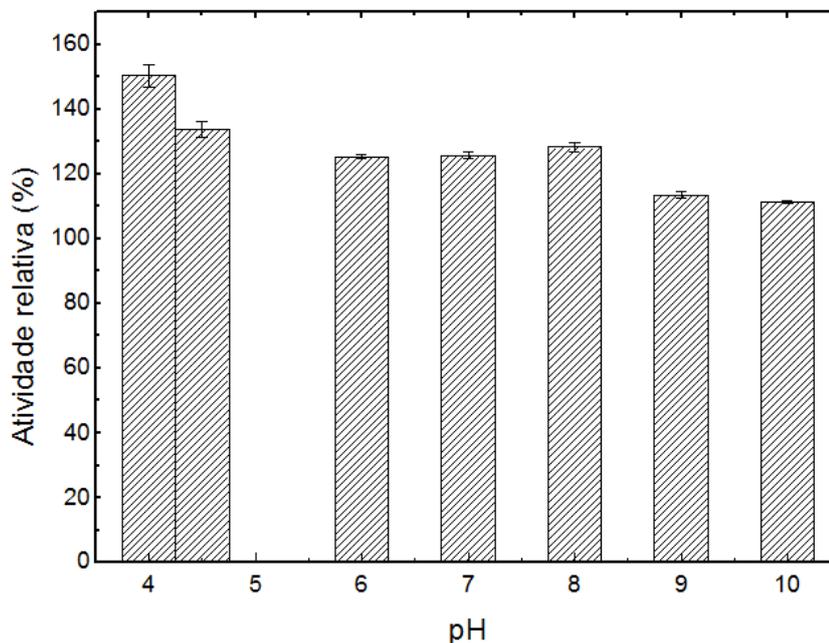
Figura 4.3 Atividade específica (UTBU/mg) ao longo do tempo (h) no sobrenadante centrifugado, após extração de proteínas do extrato sólido de mamona em fase aquosa, a 25 °C, em diferentes pHs, 50 mM



Visando elucidar se o pH utilizado na extração causa desnaturação da enzima com o passar do tempo, mediu-se a estabilidade da lipase do extrato sólido de mamona nos pHs de extração após 4 horas de incubação. Foram mensurados os valores da atividade total tanto da enzima presente na massa de mamona quanto da lipase livre, que se difunde para a fase aquosa com o tempo de incubação. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.4.

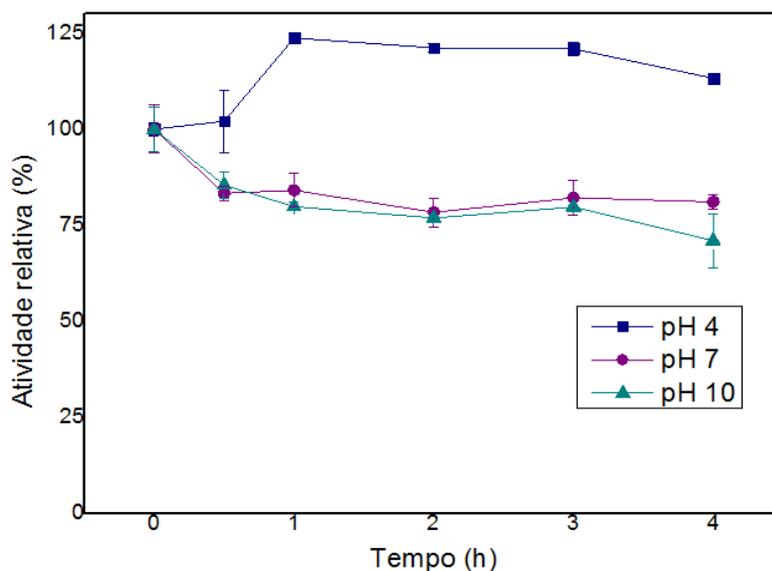
Os resultados mostram a ocorrência de uma aparente ativação da enzima com a incubação, aumento esse mais expressivo a pHs 4 e 4,5. O pH 4 é bem próximo ao ponto isoelétrico da enzima, que é 4,5 (FUCHS C. et al., 1996). Logo, ela deve estar com alta hidrofobicidade, o que auxilia em sua adsorção ao substrato, levando a velocidades de reação e, portanto, o que explica as atividades mais altas obtidas

Figura 4.4 Atividades totais relativas às iniciais (%) após 4 horas de incubação de lipase ácida de mamona (no extrato e solúvel), a diferentes pHs, a 25°C.



Contudo, ainda que menor, parece haver também alguma ativação também após incubação da enzima a pHs mais altos. Experimentos envolvendo medida da atividade do extrato após incubação são sujeitos a mais erros que os realizados apenas com enzima solúvel. Assim, visando entender melhor o fenômeno, acompanhou-se apenas a atividade da enzima já extraída (solúvel) com o tempo, a diferentes pHs.

Figura 4.5 Atividades relativas à inicial (%) em função do tempo(h), durante incubação de ESM a diferentes pHs, a 25°C.



Na Figura 4.5 se apresentam os resultados de estabilidade da lipase ácida solúvel a pHs 4, 7 e 10. Os resultados obtidos mostram claramente que há ativação da enzima solúvel nos pHs

ácidos e redução após incubação a pHs 7 ou mais altos. A estabilidade da enzima solúvel com o pH após 30 minutos de incubação indica que o aumento ou redução de atividade deve ser causado por alterações da carga na superfície da enzima com a incubação a diferentes pHs, que não são totalmente revertidas ao se medir a atividade a pH 4,5, onde a enzima adquire a maior hidrofobicidade. A ativação com a incubação a pHs 4-5 provavelmente se deve ao fato da enzima estar armazenada no pH onde foi extraída (pH 7) e o tempo usado na medida de atividade a pH 4,5 não foi suficiente para ela atingir a configuração mais ativa para a hidrólise da tributirina, após 1 hora de incubação.

A Fig. 4.1 mostra que os melhores resultados de extração de lipase ácida no extrato sólido da mamona foram observados para os pHs 7 e 10. Os mesmos foram, então, testados para extração na semente dormente de mamona não desengordurada.

Essa técnica de extração diretamente da semente foi aplicada por Ory et al. 1962), Ory et al. (1969) e Fush (1996). Ory (1962) pontuou que a lipase é extraída junto de seu substrato, que é retirado em sua maioria na moagem com acetona, durante a preparação do extrato sólido, com que se trabalhou anteriormente. No trabalho citado, a lipase é extraída da camada gordurosa formada após a centrifugação da semente de mamona macerada junto ao tampão com pH 7, com essa camada gordurosa contendo tanto a enzima quanto o substrato. A camada de gordura é então submetida a extração do óleo com solvente orgânico, dosando-se a seguir a enzima que deve ter permanecido na fase aquosa. Esse procedimento tem a potencial vantagem de eliminar a maioria das proteínas solúveis da mamona que ficam dispersas na fase aquosa, uma vez que somente lipases ficariam na camada gordurosa, ligadas ao seu substrato.

Tabela 4.1 Atividade enzimática (UTBU/mL) e concentração de proteínas (mg/mL) após extração da lipase ácida da semente de mamona dormente para fase aquosa em tampão

		Atividade (UTBU/mL)	Proteínas totais	Atividade específica (UTBU/mg)
pH 7	Fase aquosa	3,15 ± 0,27	18,2 ± 0,5	0,17
	Camada de óleo	Sem atividade	0,7 ± 0,2	-
pH 10	Fase aquosa	3,12 ± 0,29	18,1 ± 1,4	0,17
	Camada de óleo	Sem atividade	1,4 ± 0,1	-

A Tabela 4.1 apresenta os resultados da extração da lipase da semente, tanto da camada de gordura formada após trituração e centrifugação da semente junto ao tampão de extração, quanto da fase aquosa remanescente, após a retirada da camada de gordura.

A extração da lipase no grão da semente de mamona dormente não apresentou efeito com a variação do pH, obtendo-se para os dois pHs testados o mesmo desempenho. Não foi medida

nenhuma atividade na fase aquosa separada do óleo, após extração deste com solvente da camada de óleo obtida. Esperava-se obter a lipase bem mais pura do que a que já havia sido obtida na extração do ESM, mesmo que com menor rendimento. A não detecção de atividade na fase aquosa, após separação do substrato hidrofóbico, foi inesperada. Esse método deve requerer uma técnica muito mais apurada do que a utilizada neste trabalho. A fase aquosa remanescente após a retirada da camada gordurosa, por outro lado, apresentou atividade enzimática, porém com já esperada atividade específica muito baixa, pois se esperava que a maior parte da lipase permanecesse ligada à camada gordurosa. Decidiu-se, então, buscar melhorias no processo de extração do ESM.

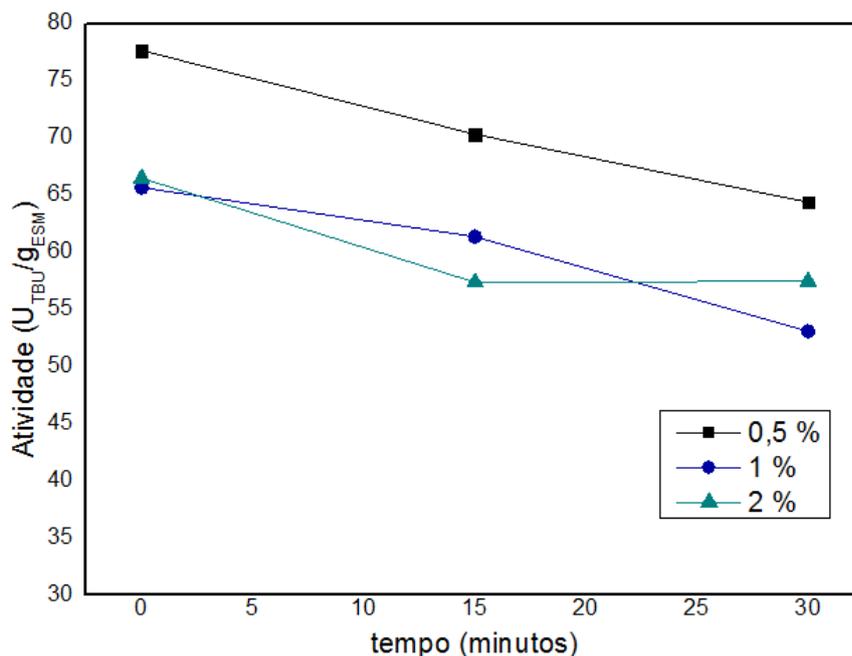
4.1.2 Extração de lipase do ESM utilizando tensoativo

A presença de tensoativo no tampão de extração visava diminuir a hidrofobicidade do meio, criando condições mais seletivas de extração de lipase que a de proteínas mais solúveis em água. Contudo, deve-se levar em conta que a atividade da lipase varia em função da concentração do tensoativo (FERNÁNDEZ-LORENTE, et al., 2007).

A lipase, na ausência de interface orgânica ou tensoativo, se encontra na conformação fechada. Na presença do tensoativo, o equilíbrio é deslocado para a conformação aberta, atingindo máxima atividade catalítica. No entanto, o aumento da concentração de tensoativo para além da concentração micelar crítica pode inibir a atividade enzimática devido à forte interação do tensoativo com o sítio catalítico, que pode distorcer sua estrutura ativa (FERNÁNDEZ-LORENTE, et al., 2007). As propriedades catalíticas podem ser modificadas por dois mecanismos na presença do tensoativo: primeiro, pela interação do tensoativo com o sítio catalítico da enzima, que pode reduzir competitivamente a afinidade da enzima pelo substrato; e segundo, pelo deslocamento do equilíbrio para sua conformação aberta, causando um aumento da velocidade máxima (V_{max}) da enzima (FERNÁNDEZ-LORENTE, et al., 2007).

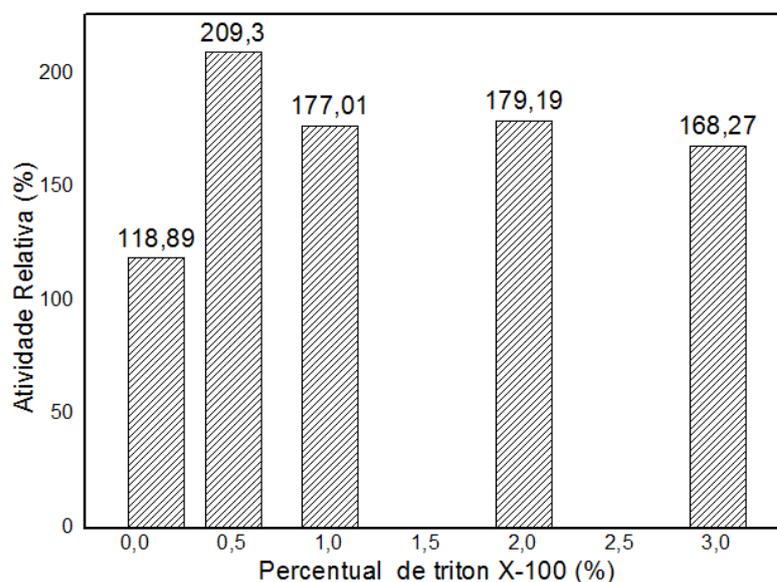
Conhecendo a possibilidade de inativação pelo tensoativo, a estabilidade da enzima foi testada na presença de diferentes concentrações dos tensoativos Triton X-100 (Figura 4.6) e Dodecil sulfato de sódio (SDS).

Figura 4.6 Atividade enzimática (UTBU/g) em função do tempo (min), durante incubação de ESM a diferentes concentrações de Triton X-100 a 4°C, tampão acetato 50 mM, pH 4,5



A lipase ácida de mamona não apresentou atividade na presença de SDS, mesmo em uma baixa concentração de 0,1 % (M/V) na solução. Os resultados da exposição ao triton X-100, mostrados na Figura 4.6, indicam redução da atividade enzimática com o passar do tempo, mesmo por um curto período de 30 minutos, em todas as 3 concentrações testadas. Além disso, foi observada diminuição da atividade com o aumento da concentração do tensoativo, causada pela competição do sítio ativo entre o substrato e o tensoativo.

Figura 4.7 Atividade relativa (%) do ESM, após a adição de Triton X-100 a diferentes concentrações



Na Figura 4.7, se apresentam os resultados calculados para atividade lipolítica no ESM, após adição de Triton, relativa à medida na ausência do tensoativo (condição padrão de medida de atividade). Os resultados apresentados nas Figuras 4.6 e 4.7 indicam, assim, que a condição de tensoativo que promoveu a maior atividade catalítica da lipase da mamona foi 0,5% (m/V) de Triton X-100. Nessa concentração, a atividade relativa foi maior do que a atividade medida sem a adição de tensoativo.

O ensaio de extração com tensoativo foi realizado em pH 4,5, sendo este o pH ótimo da enzima e que promove pouca solubilização da lipase, a fim de avaliar se a aplicação do tensoativo aumentaria a solubilização das proteínas. A força iônica do tampão foi mantida em 50mM, a mesma aplicada nos ensaios anteriores de extração. Empregou-se na extração o percentual de Triton X-100 que obteve maior atividade enzimática (0,5 %).

Tabela 4.2 Atividade lipolítica (UTBU/mL) e concentração de proteínas totais(mg/mL) ao longo do tempo (h), na extração de lipase ácida do ESM em fase aquosa, em pH acetato 4,5, 25 °C e 0,5% (M/V) Triton X-100. Proteínas e atividade medidas no sobrenadante centrifugado.

	ATIVIDADE (U_{TBU}/ML)	PROTEÍNAS TOTAIS (MG/ML)
1 MIN	3,77 ± 0,1	35,5 ± 1,61
15 MIN	5,37 ± 0,95	36,87± 0,82
30 MIN	4,14 ± 0,34	36,17± 1,25
DIALISADO 30 MIN	2,59 ± 0,06	36,92± 1,21

A Tabela 4.2 apresenta os resultados da extração com Triton x -100 e indica que a aplicação do tensoativo promoveu o aumento da atividade medida da lipase, se comparado com a atividade extraída na ausência de tensoativo, em pH 4 (0,45 U_{TBU}/mL). Ocorre também um aumento de 25 vezes das proteínas totais extraídas, demonstrando que a utilização do tensoativo aumenta a extração de proteínas totais. Foi observada, ainda, redução da atividade com o tempo de exposição da lipase ao triton X-100, provavelmente pela inativação causada pelo tensoativo, como já demonstrado, através do teste de estabilidade ao tensoativo. Logo, para ensaios posteriores, será aplicado o tempo de 15 minutos para extração com o tensoativo.

Foi realizada a diálise ao final do processo (30 minutos de extração) para remoção do triton X-100, visando evitar o aumento da inativação da enzima com o tempo de exposição, bem como o aumento da atividade lipolítica da enzima, pelo deslocamento do equilíbrio para a forma aberta, que poderia mascarar os resultados da extração.

4.1.3 Extração sequencial

Os resultados obtidos até o momento mostraram ocorrências de baixa atividade específica em todas as extrações realizadas, o que sugere potencial benefício de um processo de extração realizado em etapas sequenciais. Inicialmente, realizar-se-ia a extração das proteínas que não são de interesse e posteriormente a extração da lipase. Esta é uma estratégia interessante que pode aumentar a seletividade da extração, e conseqüentemente, aumentar também a atividade específica com pouca perda de enzima.

Tabela 4.3 Atividade lipolítica (UTBU/mL), concentrações de proteínas totais (mg/mL) e atividade específica (UTBU/mg) na extração de lipase ácida de ESM em fase aquosa, a pH6, seguida de extração sequencial a pH 10, sem tensoativo, e em pH 7, com e sem tensoativo. Proteínas e atividade medidas no sobrenadante centrifugado.

	Atividade (UTBU/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade Específica (UTBU/mg)
Extração inicial: pH 6	1,59 ± 0,19	3,65 ± 0,67	0,43
Extração sequencial: pH 7	3,24 ± 0,65	1,94 ± 0,04	1,67
Etapa única: pH 7	3,26 ± 0,2	4,7 ± 0,04	0,69
Extração sequencial: pH 10	4,7 ± 0,31	6,45 ± 0,3	0,72
Etapa única: pH 10	5,4 ± 0,19	12,52 ± 0,12	0,43
Extração sequencial: pH 7, 0,5 % Triton dialisado	5,69 ± 0,3	3,01 ± 0,3	1,89

Realizou-se inicialmente, então, uma extração em tampão fosfato pH 6, por 1 hora, pois nessa condição ocorre alta extração de proteínas, com baixa porcentagem de extração da lipase (20% do total presente no ESM, no tempo de uma hora). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, realizando-se a extração da lipase remanescente no ESM em tampão fosfato pH 7, por 1 hora, tampão carbonato pH 10, por 1 hora, e tampão fosfato pH 7, contendo 0,5 % de triton X-100, por 15 minutos. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.3. Essas condições apresentaram maior extração que o pH 6.

A Tabela 4.3 exhibe os resultados das medidas de atividade lipolítica e de proteínas totais extraídas pela estratégia proposta. Observa-se que, conforme previsto, há pequena perda da enzima desejada na extração inicial a pH 6,0, com maior extração das proteínas não desejadas. Comparando os resultados da extração sequencial com a extração de etapa única, percebe-se ocorrer sempre o esperado aumento da atividade específica. A pH 10, contudo, ocorre também perda da atividade extraída. A extração sequencial se mostrou assim efetiva para obtenção de maior atividade específica e, conseqüentemente, maior pureza da enzima, o que facilitará os estudos cinéticos que se pretende realizar a seguir.

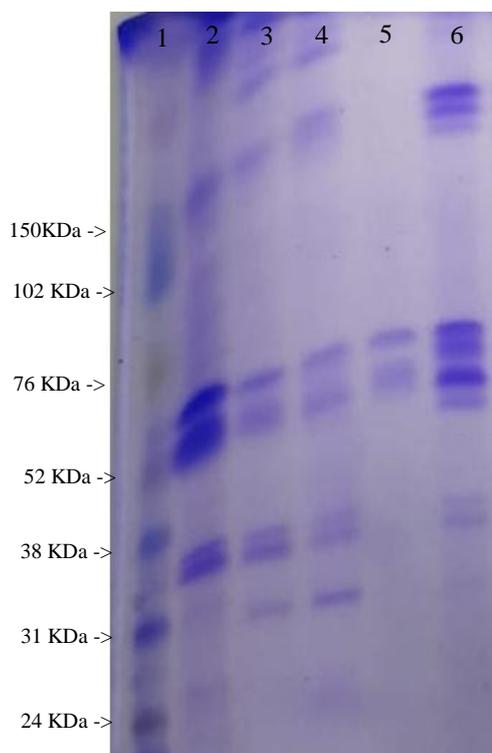
As extrações sequenciais que obtiveram maior rendimento de extração, em atividades por mL do extrato, foram as realizadas em pH 10 e em pH 7 com o tensoativo. Em termos de atividade específica, foram obtidos maiores rendimentos nas realizadas a pH 7 e a pH 7 com o tensoativo.

Tabela 4.4 Atividade total (UTBU) extraída em extração sequencial, rendimento de extração (%) e atividade total (UTBU) ESM após extração. Proteínas e atividade medidas no sobrenadante centrifugado

	Atividade total extraída (U _{TBU})	Rendimento de extração	Atividade total ESM após extração (U _{TBU})
Extração sequencial: pH 7	116,64	42%	-
Extração sequencial: pH 10	169,2	61%	70
Extração sequencial: pH 7, 0,5 % Triton dialisado	216,2	78%	108

A Tabela 4.4 apresenta a atividade total extraída nos ensaios de extração sequencial. Em todos os ensaios, a atividade oferecida foi de 276 U_{TBU} na massa de extrato sólido de mamona. A extração sequencial em pH 7 e 0,5% triton X-100 extraiu a maior quantidade de lipase (78% da atividade oferecida), além de ter obtido a maior atividade específica.

Figura 4.8 Eletroforese SDS-Page em condições desnaturantes da lipase de mamona. 1 - marcador molecular de massa peso molecular em kDa; 2 – Extração no ESM da lipase em tampão fosfato pH 6; 3 –Extração no ESM da lipase em extração sequencial pH 7; 4 - Extração no ESM da lipase em extração sequencial em pH 7 com triton 0,5 % (M/V); 5 – Extração na semente de mamona em pH 10 da camada de óleo; 6 – Extração na semente de mamona em pH 10 da fase aquosa.



A Figura 4.8 apresenta a eletroforese de algumas extrações. A lipase de mamona tem tamanho de 60 KDa, faixa que está presente em todos os poços de corrida. É possível verificar que na extração do ESM em pH 6, foram extraídas proteínas de tamanhos diferentes, formando bandas extensas e pouca definidas (poço 2). Na segunda etapa da extração sequencial no pH 7 (poço 3) e 0,5% de triton X-100 (poço 4) as faixas já são mais bem definidas, e muito parecidas nas duas extrações.

O poço 5 representa a extração no grão da semente de mamona em pH 10, amostrada da camada de óleo, e é possível enxergar duas faixas de tamanho próximo a 60 KDa. Esse resultado indica que é verdadeira a afirmação de Ory (1962), de que a camada de gordura contém principalmente os substratos da lipase e a própria enzima, com as outras proteínas permanecendo dissolvidas na fase aquosa, porém a quantidade de lipase extraída da camada de gordura não foi suficiente para medir sua atividade. É possível observar que a enzima também fica dispersa na fase aquosa da extração no grão da semente de mamona junto às demais proteínas extraídas, como pode ser verificado no poço 6.

4.1.3 Influência da razão entre massa de ESM e volume de extração nos parâmetros da extração

As extrações do extrato sólido de mamona realizadas até então foram feitas na proporção de ESM/tampão 1:10 (M/V). Na expectativa de se obter um extrato enzimático bruto de maior concentração, foi testada a extração com proporção de ESM/tampão 1:5(M/V). A Tabela 4.5 apresenta os resultados da extração sequencial inicialmente em tampão fosfato pH 6 50 mM e em seguida em tampão fosfato pH 7 50 mM 25 °C, com as proporções de extração 1:10 e com metade do volume utilizado na proporção de 1:5. As duas etapas de extração (pHs 6 e 7) foram realizadas na mesma proporção.

Tabela 4.5 Atividade enzimática (UTBU/mL), Atividade total extraída (UTBU), concentração de proteínas (mg/mL), proteínas totais (mg) e atividade específica (U/mg) após extração de lipase ácida do ESM em fase aquosa, em extração sequencial a pH 6 e depois a pH7, com duas diferentes razões ESM/tampão. Proteínas e atividade medidas no sobrenadante centrifugado

	Atividade (u_{tbu}/ml)	Atividade total (u_{tbu})	Proteínas (mg/ml)	Proteínas total(mg)	Atividade específica (ui/mg)
Extração ESM/tampão(m/v) 1:10	$2,13 \pm 0,16$	85,20	2,85	114	0,747
Extração ESM/tampão(m/v) 1:5	$3,68 \pm 0,21$	73,60	4,87	97,4	0,756

Observa-se que, com a redução do volume utilizado na extração, ocorre aumento da concentração da enzima e de proteínas na solução, mas há redução da atividade total extraída, sem alteração da atividade específica. Optou-se pela obtenção de maior rendimento na extração, com a razão de ESM/tampão 1:10 (M/V), e pela utilização de outra técnica para concentrar a enzima.

4.1.4 Concentração da lipase da mamona

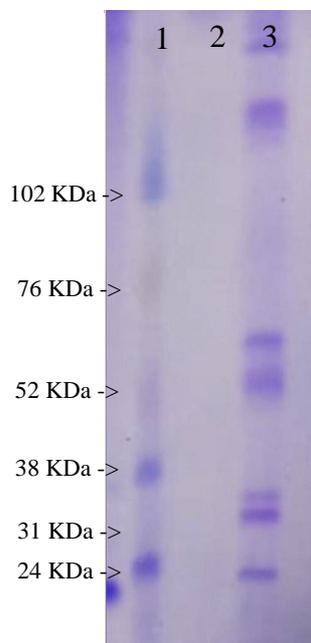
Para a concentração do extrato obtido a partir da extração sequencial, foi realizada a ultrafiltração do extrato bruto com uma membrana de 30 KDa. Os resultados estão mostrados na Tabela 4.6. Observou-se que o volume da solução foi reduzido em 10 vezes, atingindo-se uma concentração de 8,2 na atividade enzimática e 4,6 na concentração de proteínas do concentrado. Esses resultados são satisfatórios, pois perdas de enzimas sempre ocorrem, seja por permeação na membrana, seja por adsorção da enzima na membrana. Essa operação, então, se mostrou muito eficiente pois concentrou e aumentou a atividade enzimática. Porém, era esperado um aumento de 10 vezes, já que foi esta a proporção de volume reduzido.

Tabela 4.6. Volume de retentado (mL), Atividade lipolítica (UI/mL) e proteínas totais (mg/mL) antes e depois da concentração da solução de lipase ácida solúvel extraída de ESM em membrana de 30KDa livre da semente de mamona. Volume final(Vf) = 0,1 Vinicial (Vi).

	ATIVIDADE (U_{TBU}/ML)	PROTEÍNAS TOTAIS (MG/ML)	ATIV. ESPECÍFICA (U_{TBU}/MG PROT)
EXTRATO BRUTO	2,67 ± 0,06	1,71	1,56
CONCENTRA DO DE ENZIMA	21,91 ± 1,71	7,89	2,77

Foram realizadas eletroforeses das soluções antes e depois da ultrafiltração. Os resultados mostrados na Figura 4.9 indicam que não se observa a formação de banda de qualquer tamanho na eletroforese de amostra do permeado, poço 2.

Figura 4.9. Eletroforese SDS-Page em condições desnaturantes da lipase de mamona. 1 - marcador molecular de massa peso molecular em kDa; 2 – Permeado da ultrafiltração; 3 – Concentrado da ultrafiltração



Não foi possível também medir a concentração de proteínas. Embora isso possa ter ocorrido pela baixa concentração de proteínas no permeado, é também muito provável que algumas proteínas tenham se fixado na membrana de ultrafiltração no decorrer do procedimento, o que justifica a redução no número de proteínas totais após o processo de filtração. No poço 3 se apresenta a eletroforese de amostra do concentrado.

4.2 Estudos cinéticos da lipase livre de mamona

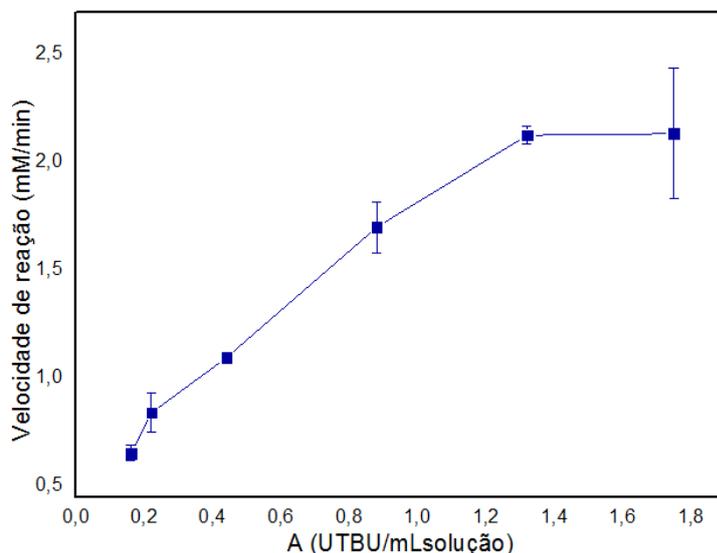
Inicialmente, estudou-se a influência da concentração enzimática na hidrólise de óleo de soja catalisada por lipase ácida de mamona solúvel LLM assim como a influência da agitação do meio, da concentração do substrato, pH e temperatura.

4.2.1 Influência da concentração enzimática

A Figura 4.10 apresenta a influência da concentração de enzima na velocidade inicial de reação de hidrólise de tributirina, catalisada por lipase solúvel. Esse experimento visa determinar a faixa linear de aumento da velocidade com a concentração de enzima, onde $C_s \gg C_{enz}$. Sempre que se realizam experimentos cinéticos que pretendem ajustar o modelo cinético de MM para representar o efeito da concentração de substrato na velocidade de reação,

é necessário determinar a faixa linear, pois essa linearidade é prevista pelo modelo cinético de MM, sendo $C_s \gg C_{enz}$ uma das hipóteses para dedução desse modelo cinético.

Figura 4.10 Velocidade iniciais (mM/min) em função de diferentes concentrações enzimáticas, para 10% de substrato, 37 °C, pH 4,5, agitação de 1000 RPM.



Observa-se a ocorrência de um crescimento linear da velocidade de hidrólise na faixa de concentração de 0,16 – 1,75 $U_{TBU}/mL_{solução}$. Acima dessa faixa, a velocidade se mantém constante, apesar do aumento da concentração de enzima. Isso se dá porque o sistema reacional não está mais se comportando segundo o modelo de MM, não se valendo da hipótese $C_s \gg C_{enz}$ para concentrações de enzima maiores que a mencionada. Os novos experimentos cinéticos utilizaram-se então de concentração enzimática dentro dessa faixa linear.

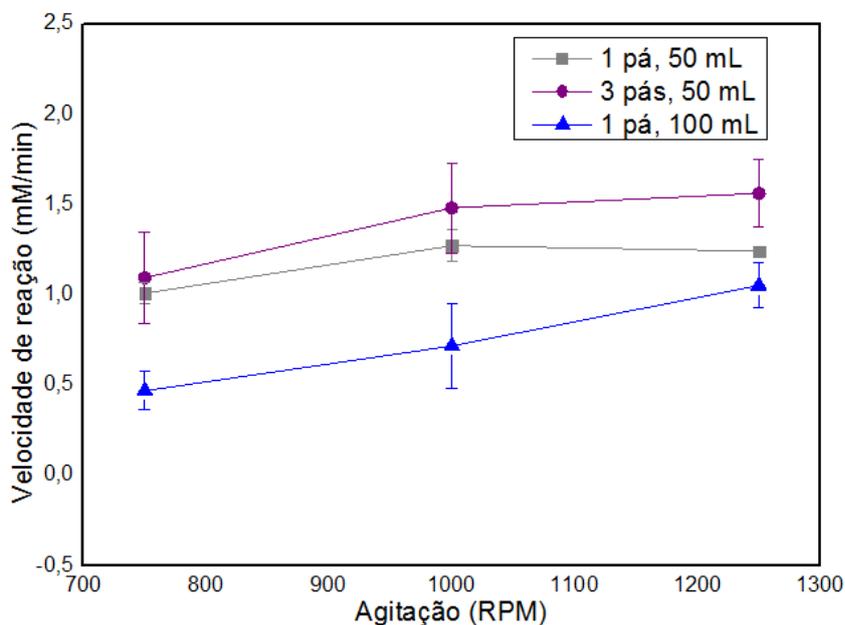
4.2.3 Influência da agitação

A velocidade inicial da reação intrínseca de hidrólise de óleo catalisada por lipase solúvel de mamona, assim como em todas as reações de hidrólise catalisadas por lipases, irá depender do tamanho da área interfacial formada entre o substrato hidrofóbico e a fase aquosa, onde se encontra a enzima, já que a reação ocorre na interface do sistema bifásico. Dessa forma, essa reação requer agitação para formação da emulsão formada por gotas de óleo rodeadas de água. A primeira fase da reação é a adsorção da enzima na interface hidrofóbica.

Conforme discutido no capítulo 2, quanto maior a área, mais moléculas de enzima podem se ligar a moléculas de substrato, com consequente aumento da velocidade de reação. Para o mesmo diâmetro de gota, a área aumenta com o aumento da massa de óleo que é

contatada com uma mesma massa de água. Para uma massa de óleo fixa, o diâmetro da gota diminui com o aumento da velocidade de agitação. A reação com enzima solúvel deverá ocorrer mais rápida de que quando se utiliza a enzima como ESM. A enzima na forma sólida impor uma nova etapa no processo de hidrólise, pela necessidade de difusão na camada estagnada que envolve a partícula de ESM. Assim, com a enzima solúvel, atingida a velocidade de agitação que conduz ao mínimo tamanho de gota para uma determinada concentração de substrato, a velocidade da reação para uma concentração de enzima fixa irá depender apenas da razão massa óleo/massa de água, isto é, da concentração de óleo. Os parâmetros a serem estimados pelo ajuste de modelo cinético a dados de velocidade inicial da reação em função da concentração de substrato deverão ser os parâmetros cinéticos intrínsecos. A comparação destes com os valores obtidos por Corradini et al, 2019, para a mesma reação de hidrólise aqui estudada, mas catalisada pelo ESM, permitirão avaliar a influência da etapa de difusão na camada estagnada nesse processo.

Figura 4.11 Velocidade iniciais (mM/min) da hidrólise de óleo de soja para 10% de substrato, 37 °C, pH 4,5, 0,72 $U_{TBU}/mL_{SOLUÇÃO}$. Em função de diferentes regimes de agitação, volume de 100 mL e agitação com 1pá, volume de 50 mL e agitação com 1pá e volume de 50 mL e agitação com 3 pás.



A Figura 4.11 mostra os resultados da influência da agitação na velocidade inicial de reação para diferentes sistemas testados. Foi observado que, para um volume de 100 mL em um reator com diâmetro de 5 cm e um agitador mecânico de 3,5 cm de 1 pá, mesmo se aplicando altas rotações na agitação, a velocidade de reação continuava a crescer com o aumento da agitação, não atingindo o tamanho mínimo possível de gota para a concentração de óleo usada.

Optou-se, então, por testar um volume menor, 50 mL, mantendo as dimensões do reator e agitador. Essa alteração permitiu atingir uma condição onde não se notou a interferência da velocidade de agitação na velocidade de reação, ou seja, a partir de 1000 rpm, fixadas as demais condições experimentais, se atinge o diâmetro mínimo de gota, ou maior área possível da interface entre a fase aquosa e a fase lipídica.

Em seguida, testou-se a utilização de um agitador com 3 pás para o volume de 50 mL, na tentativa de diminuir a rotação necessária para uma área interfacial máxima. Não se observou diminuição da rotação mínima, para as três velocidades testadas. Os pontos dos ensaios com 50 mL, uma ou três pás, parecem estar dentro do erro experimental, demandando talvez ensaios em mais rotações para melhor observação. Contudo, uma vez que houve um acréscimo aparente na velocidade de reação com o reator com três pás, para as agitações mais vigorosas testadas, optou-se por se utilizar esse arranjo experimental para os ensaios seguintes.

4.2.3 Influência da concentração de substrato

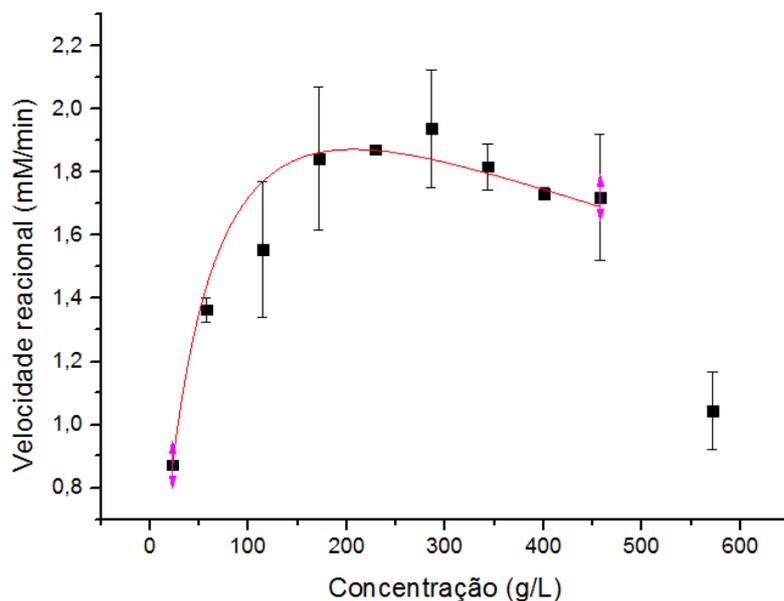
Nos ensaios para estudar a influência da concentração de substrato na velocidade de reação, utilizou-se o método de velocidades iniciais de reação a 37 °C, em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5, agitação 1000 rpm, agitador com três pás, volume reacional de água constante de 40 mL e massa de óleo variável. A concentração de substrato (óleo de soja) variou de 22,88 a 572,08 g/L, mantendo-se o volume 40 mL de tampão e 36 U_{TBU} de atividade enzimática para todos os ensaios, garantindo-se a mesma concentração de enzima em todos.

Os pontos experimentais $V_i=f(C_s)$ mostraram comportamento semelhante ao observado por Corradini et al, 2019, que utilizaram a enzima na forma sólida. Optou-se, então, por ajustar o mesmo modelo cinético utilizado por esses autores aos dados obtidos neste trabalho, com enzima solúvel: modelo de Michaelis-Menten, com inibição por excesso de substrato.

Os resultados obtidos no ajuste estão apresentados na Figura 4.10. Pode-se observar que o aumento da concentração de substrato resultou no aumento da velocidade inicial até ser atingida a velocidade máxima de 1,95 mM/min, para a concentração de 343,25 g/L de óleo de soja. Para concentrações maiores do que essa, observou-se diminuição da velocidade inicial de reação.

Da mesma forma que ocorreu nos ensaios reportados por Corradini et al, 2019, a queda da velocidade inicial que ocorre para altas concentrações de substrato deve ser causada pela coalescência das gotas de óleo, dado o aumento da massa de óleo para a mesma massa de água, o que aumenta a viscosidade da solução e reduz da área superficial da interface óleo/água.

Figura 4.12 Velocidades iniciais experimentais e simuladas (mM/min) em função da concentração de óleo de soja (M), após ajuste do modelo cinético de Michaelis – Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais, na hidrólise de óleo catalisada por lipase solúvel de mamona. Reações em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 a 37 °C, sob agitação constante de 1.000 rpm e 0,9 U_{TBU}/mL_{solução}.



Para a concentração 572,08 g/L, quando se tinha uma concentração de 50% de óleo, é observada uma queda drástica da velocidade. Essa queda pode ser consequência da inversão de fases, onde a emulsão passou a ser de gota de água contendo enzima, rodeadas por uma fase contínua de óleo. Nesse sistema, ocorre o “aprisionamento” da enzima nessas gotas de água, com diminuição da concentração de enzima na interface água-óleo, resultando num sistema reacional de empenho mais baixo.

O modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato foi ajustado aos dados de variação de velocidade a partir da variação da concentração de substrato, usando o *software* OriginPro 9.0® e aplicando um algoritmo de interação não-linear pelo método de Levenberg Marquadt. Foi excluído do ajuste o ponto da concentração de 572,08 g/L de substrato, pois para essa concentração o sistema reacional se modifica, mudando a concentração enzimática. A Tabela 4.7 mostra os valores estimados para os parâmetros V_{max}/U_I , K_M e K_S através do ajuste do modelo cinético de MM com inibição pelo substrato aos pontos experimentais de $V_i=f(C_s)$ obtidos.

Na Tabela 4.7 também se apresentam os valores dos parâmetros estimados por Corradini et al. (2019), que aplicaram o mesmo modelo cinético para a reação catalisada por extrato sólido de mamona. Os parâmetros cinéticos do modelo da enzima livre são os parâmetros intrínsecos da lipase de mamona, enquanto os parâmetros cinéticos do ESM são valores aparentes, devido aos efeitos difusionais do substrato para a enzima. A camada de

líquido estagnado em torno do extrato sólido dificulta/retarda o acesso do substrato à enzima. Logo, V_{\max}/U_{hyd} é maior para a enzima livre do que para a enzima presente no extrato sólido da semente. Observa-se também a diminuição do valor de K_M para a enzima livre, indicando que quando a enzima está presente na forma sólida, o valor real da concentração de substrato em contato com a enzima é menor que o existente quando a enzima está na forma solúvel, resultando em menor velocidade de reação para ESM do que para a mesma concentração de LLM. Esse atraso difusional resulta, assim, em valores estimados de V_{\max}/U_{hyd} menores e de K_m maiores para o sistema onde a enzima está sólida (ESM).

Tabela 4.7 Parâmetros cinéticos (V_{\max}/U_I), K_m e K_s estimados pelo ajuste de modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato, aos dados de $V_i=f(C_s)$, na hidrólise de óleo de soja catalisado por lipase ácida de mamona na forma de extrato sólido de mamona (ESM) (CORRADINI et al, 2019) e por lipase ácida extraída de ESM, livre ou solúvel e concentrada (LLM).

Parâmetros	Lipase sólida ESM CORRADINI et al, 2019	Lipase solúvel ou livre LLM Este trabalho
K_M (mM)	192.63±76.5	49,26 ± 2,37
$VM_{\text{Máx}}/U_I$ (mmol·U _{hyd} ⁻¹ ·min ⁻¹)	(7.77±2.28)×10 ⁻⁴	(30,7 ± 0,88)×10 ⁻⁴
K_s (mM)	1007.0±190.9	866,80 ± 108,79
Coefficiente de correlação (r ²)	0,96	0,99
Modelo ajustado	$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}}$	

Para o modelo de inibição pelo substrato, o inibidor se liga ao complexo enzima substrato em um local diferente do sítio ativo, sendo uma inibição incompetitiva. Na hidrólise de óleo de soja, catalisada tanto por ESM quanto por LLM, esse parâmetro (K_s) na verdade simula o efeito da diminuição da área interfacial e, portanto, da concentração real de substrato, que ocorre para razões massa óleo/massa água acima de 25 %, devido à agregação das gotas de óleo com o aumento da sua concentração, com consequente redução da velocidade de reação. Os valores de K_s são muito próximos para os dois sistemas estudados, o que indica que a redução da área interfacial, com consequente redução da concentração real de substrato e, portanto, da velocidade real de reação, ocorre da mesma forma para ambos os sistemas. Isso parece muito plausível, pois a concentração de enzima em ambos os sistemas é pequena e o fato de estar sólida (ESM) ou solúvel (LLM) não deve afetar a viscosidade do meio, obtendo-se efeitos semelhantes de aumento da concentração de óleo nos dois sistemas.

4.2.4 Efeitos de pH e temperatura

Os efeitos de diferentes valores de pH e temperatura na atividade das lipases livre da semente de mamona para a hidrólise da tributirina foram medidos na faixa de 4,0 a 5,0 de pH e de 30 a 50 °C para temperatura. Essas são as faixas em que o ESM tem maiores medidas de atividade (SANTOS et al.,2013). Os resultados são mostrados na Figura 4.13. A lipase livre de mamona demonstrou máxima atividade catalítica em pH 4,5, mesmo comportamento que o ESM, conforme dados de Santos et al.(2013).

Figura 4.13 Atividade enzimática (UTBU/mL) do lipase livre de mamona em diferentes pHs.

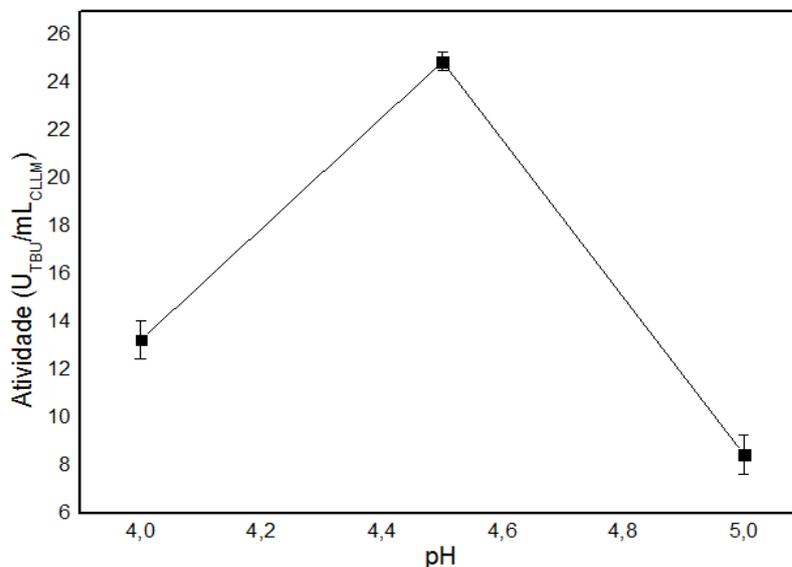
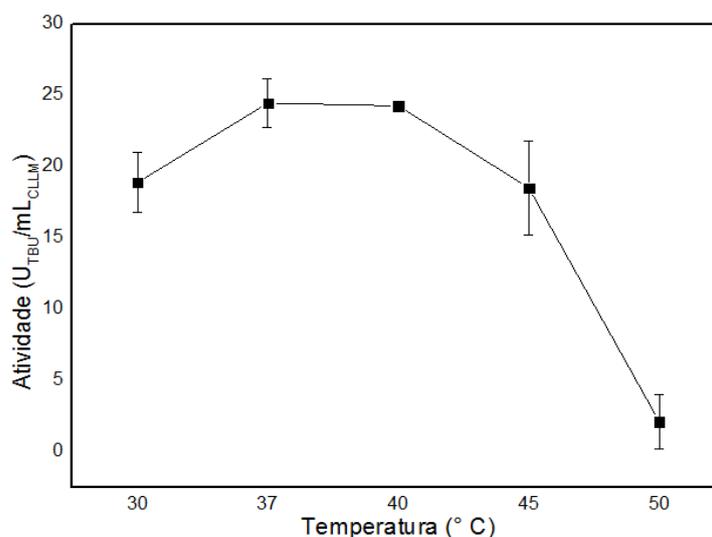


Figura 4.14 Atividade enzimática (UTBU/mL) do lipase livre de mamona em diferentes temperaturas



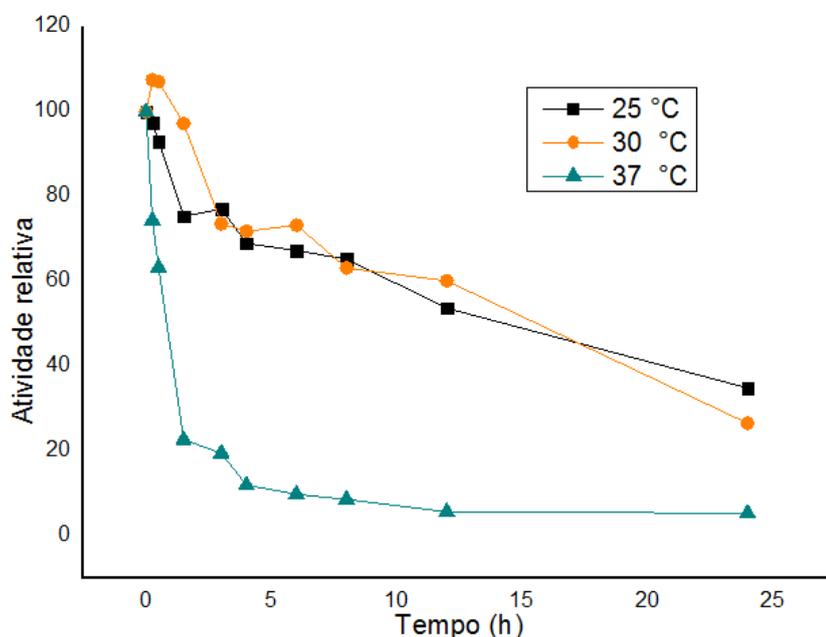
O efeito da temperatura de reação na atividade da enzima livre é exibido na Figura 4.14. As maiores atividades foram medidas nas temperaturas de 37 – 40°C e o aumento da temperatura reduziu a atividade, provavelmente devido à inativação enzimática. De acordo com Santos et al. (2013), 50 °C é a temperatura de maior atividade no extrato sólido de mamona e, para a enzima livre, a atividade é próxima de 0 U_{tbu}/mL. Evidentemente, a forma sólida implica em proteção da enzima, um fenômeno conhecido para enzima imobilizada.

4.2.5 Estabilidade Térmica

Foram realizados ensaios para medir a estabilidade da lipase ácida de mamona solúvel (LLM) nas temperaturas de 25, 30 e 37°C, ao longo de 24 horas.

A enzima solúvel apresentou baixa estabilidade térmica (Fig. 4.15). Para a temperatura de 37° C, na qual foram realizados os ensaios cinéticos da lipase, a atividade enzimática de LLM é perdida rapidamente, alcançando o tempo de meia vida em 1 hora. A partir de 12 h não se observa praticamente nenhuma atividade nessa temperatura.

Figura 4.15. Atividades relativas à inicial (%) ao longo do tempo (h), durante incubação de lipase ácida de mamona solúvel, a diferentes temperaturas. A atividade catalítica foi determinada pela hidrólise da tributirina em tampão acetato 100 mM, pH 4,5 a 37°C. Os valores de atividade foram normalizados considerando a atividade em tempo 0h como 100%.

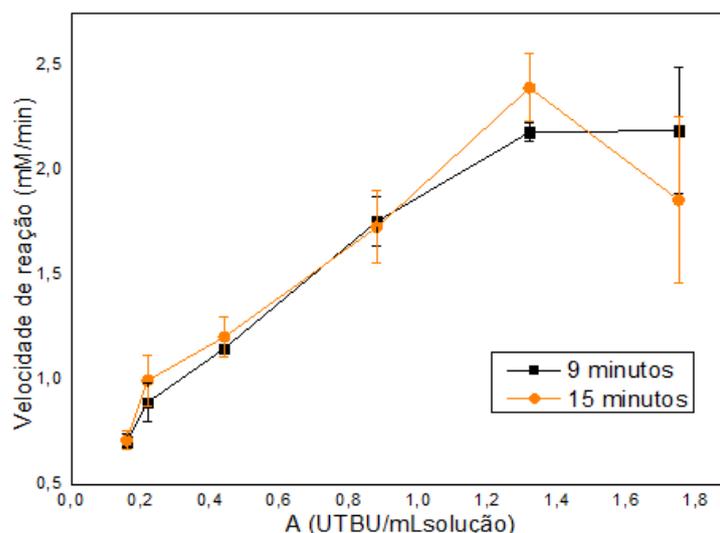


Para as temperaturas de 25 e 30 °C observa-se um decaimento similar na atividade, sendo mais lento se comparado com a temperatura de 37°C. Esse resultado é significativo quando se desejar realizar uma reação de longa duração. A meia vida para essas duas

temperaturas é atingida próximo às 12 h de incubação (Figura 4.15). A imobilização da lipase da mamona é uma estratégia importante, pois pode ser uma solução para a baixa estabilidade térmica apresentada. Em vista desses resultados, decidiu-se verificar a estabilidade operacional de LLM, para se certificar de que com o passar do tempo de reação utilizado na medida da velocidade inicial, está se mantendo constante para diferentes concentrações da enzima.

Como em 15 minutos observou-se uma redução de quase 30% da atividade para a temperatura de 37 °C, os ensaios de velocidade inicial da hidrólise de óleo de soja foram feitos com essa duração. As velocidades iniciais calculadas em 9 e em 15 minutos foram comparadas nos ensaios de influência da concentração enzimática na velocidade inicial da reação. Os resultados da comparação são apresentados na Figura 4.16

Figura 4.16 Velocidade iniciais (mM/min) em função de diferentes concentrações enzimáticas, para 10% de substrato, 37 °C, pH 4,5, agitação de 1000 RPM para diferentes tempos de reação.



Os resultados obtidos indicaram que não houve alteração das velocidades iniciais calculadas em 9 e em 15 minutos de reação. Uma possível justificativa é que a presença do substrato promove uma proteção na estrutura da enzima, desacelerando a degradação térmica que ocorre na incubação em tampão, como feito para estudo de estabilidade térmica.

5 CONCLUSÕES

- ✓ A extração da lipase ácida presente na semente de mamona para a fase aquosa foi estudada em etapa única e por extração sequencial, com análises de diferentes pHs e da influência da utilização de tensoativo no processo. Os melhores resultados foram obtidos no método sequencial, utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM (pH inicial de 6 e posteriormente pH 7) com 0,5 % de triton X-100. Obteve-se 78% de rendimento de extração e atividade específica de 1,89 (U_{TBU}/mg);
- ✓ A concentração da lipase ácida de mamona foi realizada por ultrafiltração em membrana de 30 KDa. O procedimento foi efetivo, pois permitiu a redução do volume inicial em 10 vezes e aumentou a pureza do extrato enzimático, que obteve uma atividade específica de 2,77 (U_{TBU}/mg), após concentração.
- ✓ A enzima obtida na forma solúvel pôde então ser caracterizada cineticamente, o que permitiu a comparação de suas propriedades com a enzima na forma de ESM. A enzima livre apresentou crescimento linear da velocidade de hidrólise na faixa de concentração de 0,16 – 1,75 $U_{TBU}/mL_{SOLUÇÃO}$. A temperatura de atividade máxima de 37 – 40°C para LLM é menor que a apresentada pelo extrato sólido de mamona, com atividade máxima a 50 °C, logo, a forma sólida implica proteção da enzima à desnaturação por temperatura. O pH de 4,5 é o de máxima atividade tanto para lipase livre quanto no ESM.
- ✓ Diferentes sistemas operacionais da hidrólise do óleo de soja foram testados, variando volume, velocidade de agitação e números de pás no agitador, para encontrar o sistema operacional com o diâmetro mínimo de gota, ou maior interface entre a fase aquosa e a fase lipídica. O volume de 50 mL, agitador de 3 pás e agitação de 1000 rpm foi a condição que demonstrou maior interface água/óleo.
- ✓ Ajustou-se o modelo cinético de MM com inibição pelo substrato aos dados de variação de velocidade a partir da variação da concentração de substrato. Foram estimados os seguintes valores para os parâmetros cinéticos do modelo para a enzima livre: $V_{Máx}/U_{hid}$ ($30,7 \times 10^{-4} \pm 0,88 \times 10^{-4} \text{ mmol.U}_{hid}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), K_m ($49,264 \pm 2,37 \text{ mM}$) e K_s ($866,80 \pm 108,79 \text{ mM}$). A camada de líquido estagnado em torno do extrato sólido dificulta/retarda o acesso do substrato a enzima, o que promove um menor valor real da concentração de substrato em contato com a enzima que o existente quando a mesma está na forma solúvel. Consequentemente, os parâmetros cinéticos da lipase ácida da mamona ajustados aos dados do ESM apresentaram menor $V_{Máx}/U_{hid}$ e maior valor de K_m comparados com a enzima

livre. Os parâmetros cinéticos do modelo da enzima livre são os parâmetros intrínsecos da lipase de mamona, enquanto no ESM esses valores são aparentes, devido aos efeitos difusionais do substrato para a enzima.

- ✓ Foi verificada a estabilidade da lipase ácida de mamona solúvel (LLM) nas temperaturas de 25, 30 e 37°C. A lipase solúvel apresentou baixa estabilidade a 37°C, alcançando o tempo de meia vida em 1 hora. Nas temperaturas de 30 e 25 °C, apresentou comportamento semelhante e a meia vida foi alcançada com 12 h de incubação.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Validar os parâmetros cinéticos estimados no estudo da cinética de hidrólise do óleo de soja;
- Realizar ensaios de hidrólise de longa duração para verificar inibição pelo produto;
- Imobilizar a lipase solúvel de mamona visando eliminar o problema relacionado à ricina e aumentar a estabilidade térmica da enzima;
- Realizar ensaios de adsorção em suportes hidrofóbicos e posterior dessorção para avaliar o aumento da atividade específica;
- Avaliar estabilidade e cinética enzimática após processo de imobilização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ZUHAIR, S.; et al. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1155-1163, 2003.

ARMAND ET AL. Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase—An in vitro study. **The journal of nutritional biochemistry**, v.3, p. 333-341, 1992.

AVELAR, M. H. M. et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, n.0, p. 452-458, 2013.

AZMIR J., ZAIDUL I.S.M., RAHMAN M.M., SHARIF K.M., MOHAMED A., SAHENA F., JAHURUL M.H.A., GHAFOR K., NORULAINI N.A.N., OMAR A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. v. 117, p.426–436, 2013.

BARNEBEY, H.L., BROWN, A.C. Continuous fat splitting plants using the colgate-emery process. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 25, p. 95–99, 1948.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties - a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010.

BEISSON, F. et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p. 133-153, 2000.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 7ed. New York: W. H. Freeman, p.1120, 2010.

BLOW D.; More of the catalytic triad. **Nature** v.343, p.694–695, 1990.

BRADFORD, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.

BRESSANI A. P.; GARCIA K. C. A.; HIRATA D. B.; MENDES A. A. Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: optimization by response surface methodology. **Bioprocess Biosyst Eng**. v. 38, p 287 -297, 2014.

CAJAL, Y., SVENDSEN, A., GIRONA, V., PATKAR, S.A., ALSINA, M.A., Interfacial Control of Lid Opening in *Thermomyces lanuginosa* Lipase. **Biochemistry** v.39, p.413–423, 2000.

CORRADINI F. A. S.; ALVES E. S.; KOPP W.; RIBEIRO M. P. A.; GIORDANO R. L.C.; Kinetic study of soybean oil hydrolysis catalyzed by lipase from solid castor bean seeds. **Chemical Engineering Research and Design**, 2019.

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

DE SOUSA, J. S. et al. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1–4, p. 133-137, 2010.

EASTMOND, P. J. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45540-5, 2004.

ERIKSEN, J. New technology applied to cheese production. **Food Technology in New Zealand**, p.29 & 36, june, 1985.

ER-ZHENG S., YING Z., PENG-YONG Y., DONG-ZHI W. Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization. **Journal of Shanghai Univ**, v.14, p. 137–144, 2010.

FERNANDES-LORENTE; PALOMO J.M.; CABRERA Z.; FERNANEZ-LAFUENTE R; GUISAN J. M. Improved catalytic properties of immobilized by the presence of very low concentration of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v.97, p. 242-250, 2007.

FUCHS C.; VINE N.; HILLS M. J. Purification and Characterization of the Acid Lipase from the Endosperm of Castor Oil Seeds. *Plant physiol.* v. 149, p. 23 – 29, 1996.

GODOY M. ET AL. Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 44, p. 317 – 322, 2009.

JAVED S.; AZEEM F.; HUSSAIN S.; RASUL I.; SIDDIQUE M. H.; RIAZ M.; AFZAL M. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

KIERKELS J. G. T.; VLEUGELS L. F. W.; KERN J. H. A.; MEIJER E. M.; KLOOSTERMAN M.. Lipase kinetics: On-line measurement of the interfacial area of emulsions. **Enzyme and microbial technology**, v. 12, p. 760-163, 1990.

LIU L.; YANG H.; SHIN H.D;How to achieve high-level expression of microbial enzymes strategies and perspectives. **Bioengineered** v. 4, p. 212–223, 2013.

LEHNINGHER, A. L.; Componentes moleculares das células. 2 ed. São Paulo: Edgard blucher Ltda, 1976. 262p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Principles of Biochemistry. 6. ed. New York: W. H. FREEMAN AND COMPANY, 2013. 189-190p.

LIGHTFOOT E. N., MOSCARIELLO J. S., Bioseparations, **Biotechnology and bioengineering**. v. 4, p. 259-273, 2004.

MARANGONI, A. G. Enzyme kinetics: a modern approach. John Wiley & Sons, 2003.

McCLEMENTS D.J.; WEISS J.; Lipid Emulsions, in: F. Shahidi (Ed.), Bailey's Ind. Oil Fat Prod., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, p. 457-502, 2005.

MENEGUELLI DE SOUZA L. C.; DE CARVALHO L. P.; ARAÚJO J. S.; DE MELO E. J. T. MACHADO O. L. T. Cell toxicity by ricin and elucidation of mechanism of Ricin inactivation. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 113, p 821–828, 2018.

MIERZWA, J.C e FESPANHOS, I. Água na indústria – Uso racional e reuso. Oficina de textos, São Paulo, 2005. 144p.

MME, Resenha Energética Brasileira 2018 – Ano Base 2017, Ministério de Minas e Energia, (2018).

MOHAMED, M.; MOHAMED, T. M.; MOHAMED, S. A.; FAHMY, A. S. Distribution of Lipases in the Gramineae. Partial Purification and Characterization of Esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technology*, v. 73, n. 3, p.227-234, 2000.

MOTTA V. T. Bioquímica. Rio de Janeiro. Medbook, p.488, 2001.

MUTO, S., BEEVERS, H. Lipase activities in castor bean endosperm during germination. **Plant Physiol.** v.54, p. 23–28, 1974.

NOINVILLE S. ET AL. Conformational Changes and Orientation of Humicola Lipase on a Solid Hydrophobic Surface: An in Situ Interface Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflection Study. **Biophysical Journal**, V. 82 , p. 2709–2719, 2002.

OLLIS, D. L., E. CHEAH, M. CYGLER, B. DIJKSTRA, F. FROLOW, S. M. FRANKEN, M. HAREL, S. J. REMINGTON, I. SILMAN, J. SCHRAG, J. L. SSMAN, K. H. G. VERSCHUEREN, AND A. GOLDMAN. 1992. The α/β hydrolase fold. **Protein Eng.** v. 5, p.197–211, 1992.

ORY R. L., ANGELO A. J. St., ALTHSCHUL A. M. The acide lipase of the castor bean. Properties and substrate specificity. , **J. Lipid**, v. 3, n. 1, 1962.

ORY R. L., Acid Lipase of the Castor Bean. **Lipids**, v. 4, p. 177–185, 1969.

PIEROZAN, M. K. Extração e avaliação da atividade de hidrólise e esterificação de extrato enzimático lipásico de semente de trigo (*Triticum aestivum*) após concentração com sulfato de amônio. **RAMVI**, v. 01, n. 01, 2012.

REIS, P., MILLER, R., KRÄGEL, J., LESER, M., FAINERMAN, V.B., WATZKE, H., HOLMBERG, K., Lipases at Interfaces: Unique Interfacial Properties as Globular Proteins. **Langmuir** v.24, p.6812–6819, 2008.

RIBEIRO, B. D. et al. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 615803, 2011.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid–liquid reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 947-953, 2001.

SANTOS K. C., CASSIMIRO D.M.J., AVELAR M. H.M., HIRATA D. B., CASTRO H. F., LAFUENTE R. F, MENDES A. A.; Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462– 470, 2013.

SILVA F.A.; KOPP W.; GIORDANO R. L. C. Extração de lipase de mamona (*Ricinus communis* L.) em fase aquosa. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, v. 1 n. 2, 2015.

SINGH R.; KUMAR M; MITTAL A; MEHTA P. K.; Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **Biotech** 6:174, 2016.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess engineering: Basic concepts. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 553 p.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.*, v.150, p. 76-86, 1985

SOARES, D. et al. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, n. 0, p. 15-23, 2013.

TAVARES F., PETRY J., SACKSER P.R., BORBA C.E., SILVA E.A., Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil. **Industrial Crops & Products**. v. 124 p. 254–264, 2018.

ÜLKER, S., OZEL, A., ÇOLAK, A., KARAOĞLU, S. A.. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turk J. Biol.** v. 35, p. 543-550, 2011.

VERGER R. Interfacial activation of lipase: fact and artifacts. *Trends in Biotechnology*, v. 15, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v.105, p.308–317, 2003.

VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 4 ed. Weinheim: John Wiley & Sons, 2011. 1408 p.

VOLL F.A.P.; ZANETTE A.F.; CABRAL V.F.; DARIVA C.; DE SOUZA R.O.M.A.; FILHO L.C.; CORAZZA M.L.; Kinetic Modeling of Solvent-Free Lipase-Catalyzed Partial Hydrolysis of Palm Oil, *Appl. Biochem. Biotechnol.* v.168, p.1121–1142, 2012.

YAHYA A. R. M.; ANDERSON W. A.; MOO-YOUNG M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and microbial technology**, v.23, p.458-450, 1998.