

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

EMANOELA FERNANDA QUEIROZ SANTOS

AVALIAÇÃO DE SUPORTES HIDROFÓBICOS APLICADOS À PURIFICAÇÃO DE  
ENZIMAS

SÃO CARLOS-SP

2019



EMANOELA FERNANDA QUEIROZ SANTOS

AVALIAÇÃO DE SUPORTES HIDROFÓBICOS APLICADOS À PURIFICAÇÃO DE  
ENZIMAS

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química da Universidade  
Federal de São Carlos, para obtenção  
do título de mestre em Engenharia  
Química.

Orientador: Raquel de Lima Camargo  
Giordano

São Carlos-SP  
2019



MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE EMANOELA FERNANDA QUEIROZ SANTOS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 28 DE FEVEREIRO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:



Raquel de Lima Camargo Giordano  
Orientadora, UFSCar



Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro  
UFSCar



Thiago Faggion de Pádua  
UFSCar



Willian Kopp  
Willian Kopp  
Kopp Technologies



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho à guerreira Lila e ao herói Gê, meus tão amados pais, e à minha tia-mãe Bel, cujo amor canalizado a mim durante toda uma vida converteu-se em combustível para a realização de mais esse sonho. Sem amor, eu nada seria.



## AGRADECIMENTO

Gratidão infinita sobretudo à Deus pela vida, e aos meus pais por terem me ensinado através do exemplo, a lição mais importante que já aprendi: o amor supera qualquer obstáculo. Aos meus irmãos Antônio, Breno, Lorayne e Isabella (*in memoriam*) pelas melhores memórias da infância, por todo o afeto dedicado a mim e principalmente pelos meus sobrinhos lindos Augusto, Isabella, Heitor, Conrado, Miguel e Benjamin.

Agradecimento especial à Professora Raquel Giordano, que me deu a oportunidade de ser sua última orientada de mestrado, compartilhando o vasto conhecimento obtido ao longo de toda uma carreira admirável, e ao professor Thiago Faggion de Pádua, o qual tive oportunidade de ser primeira co-orientada, por todo seu apoio e expressiva dedicação. Ao Dr. William Kopp pela parceria e conhecimento fundamentais para realização desse trabalho.

Ao coordenador do programa de pós-graduação 'Tininho', pelo apoio, acessibilidade e empenho em manter a excelência do PPGEQ. Ao Oscar, mestre da oficina mecânica que salvou meus ensaios inúmeras vezes, pelo pronto apoio de sempre.

Aos meus queridos do laboratório de enzimas: Murilo, Laiane, Ana, Renato e Letícia, vocês fizeram toda diferença para concretização desse trabalho, obrigada pela amizade e ensinamentos. Fer Soares, parceiro para todas as horas, pela paciência infinita e incansável apoio incondicional, patrocinador oficial do coffee break.

À minha prima-irmã Maíra Guedes que tanto me ajudou na mudança Minas-São Paulo, parceria fundamental para que eu encontrasse meu *home sweet home*, onde conheci Vini Pucci, o vizinho mais querido do universo, que me fez sentir em casa, mesmo estando à 600 km de distância dela.



**Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio – e eis que a verdade se me revela.**

**Albert Einstein.**



## RESUMO

As enzimas são catalisadores biológicos que apresentam diversas aplicações, representando perspectivas interessantes para uso em diversos ramos da indústria, entre eles: agroindústria, biocombustíveis e farmacêutico. No entanto, a recuperação de enzimas do caldo de cultivo é geralmente a etapa mais cara de um processo de produção, pois elas estão presentes em baixa concentração em uma mistura complexa de moléculas. Assim, é crucial usar processos de purificação apropriados (seletivos, eficientes e baratos) para separar essas biomoléculas de alto valor agregado de extratos complexos. O objetivo desse trabalho foi verificar a influência do grau de hidrofobicidade de diferentes materiais em processos de adsorção hidrofóbica, de modo a caracterizar a interação enzima-sólido além de avaliar possibilidades de aplicação com principal foco na purificação de biomoléculas. O processo de dessorção das proteínas foi avaliado de modo criterioso pela obtenção de isotermas com a presença de detergente TRITON-X-100. Inicialmente, adsorventes constituídos de matrizes de sílica funcionalizados com grupos carbono (C1 e C8) e Octil-agarose foram testados na adsorção de lipase de *Bacillus thermocatenuatus* (BTL2) recombinante presente em extrato centrifugado obtido após cultivo e rompimento de células de *E. coli*. As isotermas de dessorção, obtidas na presença de detergente, permitem avaliar interação enzima-sólido para os diferentes suportes, possibilitando classificar o grau de hidrofobicidade de diferentes suportes hidrofóbicos aplicados à purificação de proteínas. Os resultados indicaram maior interação enzima-sólido para Octil-agarose, com maior seletividade no processo de adsorção para a lipase. Esse comportamento de maior interação hidrofóbica posteriormente confirmado pela realização de ensaios com lisozima em alta pureza ao invés do extrato, provavelmente se deve à maior densidade de grupos C8 (Octil) existentes na superfície da Octil-agarose com relação à sílica-C8. A análise dos resultados indicou que mesmo com maior interação, rendimentos elevados de dessorção podem ser obtidos para Octil-agarose em consequência da grande porosidade da partícula e ainda de possíveis interações iônicas da enzima com a matriz de sílica. Assim, a porosidade da partícula e natureza da matriz adsorvente são fatores a serem considerados ao analisar resultados de dessorção para obtenção de maior elutriação de proteínas. Apesar da dificuldade de dessorção, a utilização de sílica ainda assim é interessante, principalmente para aplicações de compósitos

magnéticos, devido à sua estabilidade química e resistência mecânica. Assim, o trabalho aponta possíveis alternativas para desenvolvimento de suportes de sílica mais eficientes para processos de purificação de enzimas, como por exemplo, maior porosidade de partícula, maior neutralidade da matriz de sílica e ainda ensaios preliminares com sílica ativada com grupos menos hidrofóbicos (diol) resultando em elevado rendimento de dessorção de proteínas, porém com perdas na seletividade do processo de adsorção.

**Palavras-chave:** Isotermas de dessorção. Hidrofobicidade de suportes. Purificação enzimática. Adsorção hidrofóbica. Lipases. Suportes de sílica. Octil-agarose.

## ABSTRACT

Enzymes are biological catalysts that present diverse applications, representing interesting perspectives for use in several branches of the industry: agribusiness, biofuels, and pharmacist. However, the recovery of broth enzymes is generally the most expensive step of a production process, as they are present in low concentration in a complex mixture of molecules. Thus, it is crucial to use appropriate (selective, efficient and inexpensive) purification processes to separate these high value-added biomolecules from complex extracts. The objective of this work was to verify the influence of the degree of hydrophobicity of different materials in hydrophobic adsorption processes, in order to characterize the enzyme-solid interaction besides to evaluate possibilities of application with main focus in the purification of biomolecules. The desorption process of the proteins was evaluated in a judicious manner by obtaining isotherms with the presence of TRITON-X-100 detergent. Initially, adsorbents constituted of silica matrices functionalized with carbon groups (C1 and C8) and octyl sepharose were tested on lipase adsorption of recombinant *Bacillus thermocatenulatus* (BTL-2) present in the centrifuged extract obtained after culturing and disruption of *E. coli* cells. The desorption isotherms, obtained in the presence of detergent, allow the evaluation of enzyme-solid interaction for the different substrates, making it possible to classify the degree of hydrophobicity of different hydrophobic supports applied to the purification of proteins. The results indicated higher enzyme-solid interaction for octyl sepharose, with greater selectivity in the adsorption process for lipase. This behavior of higher hydrophobic interaction later confirmed by high-purity lysozyme assays rather than the extract is probably due to the higher density of C8 (octyl) groups on the surface of octyl agarose with respect to C8 silica. Analysis of the results indicated that even with higher interaction, high desorption yields can be obtained for octyl agarose as a consequence of the large porosity of the particle and also of possible ionic interactions of the enzyme with the silica matrix. Thus, the particle porosity and nature of the adsorbent matrix are factors to be considered when analyzing desorption results to obtain higher protein elutriation. Despite the difficulty of desorption, the use of silica is still interesting, especially for applications of magnetic composites, due to its chemical stability and mechanical resistance. Thus, the work points out possible alternatives for the development of more efficient silica substrates

for enzyme purification processes, such as higher particle porosity, higher silica matrix neutrality and preliminary tests with silica activated with less hydrophobic groups (diol ) resulting in high desorption yield of proteins, but with losses in the selectivity of the adsorption process.

Keywords: Desorption isotherms. Hydrophobicity of supports. Enzymatic purification. Hydrophobic adsorption. Lipases. Silica supports. Octyl sepharose.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1 Reações catalisadas por lipases.....	6
Figura 2-2.Estrutura da conformação aberta da BTL2. ....	8
Figura 2-3 Subprocessos de recuperação do produto intracelular.....	11
Figura 2-4 Representação dos tipos de isotermas. ....	15
Figura 2-5 Representação gráfica de modelos clássicos de isotermas.....	16
Figura 2-6 Esquema com os principais tipos de suporte utilizados para imobilização .....	19
Figura 2-7 A formação de grupos silanol na superfície da sílica: (a) polimerização de condensação; (b) Reidroxilação. ....	21
Figura 4-1 Umidade em base úmida (%) em função do tempo do suporte PURIFICA- Y-C1, durante incubação em tampão fosfato 5 mM. ....	36
Figura 4-2 Umidade em base úmida (%) em função do tempo do suporte PURIFICA- Y-C8, durante incubação em tampão fosfato 5 mM. ....	37
Figura 4-3 Umidade em base úmida (%) em função do tempo do suporte PURIFICA- X-C16, durante incubação em tampão fosfato 5 mM. ....	37
Figura 4-4 Cinética de Adsorção de BTL-2 em Suporte PURIFICA-Y-C1 .....	39
Figura 4-5 Cinética de adsorção de BTL-2 em Suporte PURIFICA-Y-C8 .....	40
Figura 4-6 Cinética de Adsorção de BTL-2 em Octil-Agarose.....	40
Figura 4-7 Cinética de Adsorção de Lisozima em Suporte PURIFICA-Y-C1 .....	41
Figura 4-8 Cinética de Adsorção de Lisozima em Suporte PURIFICA-Y-C8 .....	42
Figura 4-9 Cinética de Adsorção de Lisozima em Suporte Octil-agarose .....	42
Figura 4-10 Representação da influência de Beta no rendimento de dessorção para diferentes isotermas .....	48
Figura 4-11 Cinética de dessorção de BTL-2 em Suporte PURIFICA-Y-C1 .....	52
Figura 4-12 Cinética de dessorção de BTL-2 em Suporte PURIFICA-Y-C8 .....	53
Figura 4-13 Cinética de dessorção de BTL-2 em Octil-Agarose .....	53
Figura 4-14 Isotermas de dessorção de BTL-2 dos suportes hidrofóbicos PURIFICA- Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose. Força iônica 5mM pH7, a 25°C 50 rpm e 16h. ....	57
Figura 4-15 Comparação entre os suportes PURIFICA-Y-C1 E PURIFICA-Y-C8.....	59

Figura 4-16 Variação do rendimento de dessorção com Beta. Dados experimentais e modelo previsto. ....	61
Figura 4-17 Isotermas de dessorção C1, C8 e Octil-agarose em base úmida.....	63
Figura 4-18 Variação do rendimento de dessorção com Beta. Dados experimentais e modelo previsto. ....	63
Figura 4-19 Isotermas de dessorção contendo ensaios preliminares do DIOL.....	65
Figura 4-20 Isotermas de dessorção de BTL-2 contemplando ensaios para avaliação do efeito de temperatura para o suporte PURIFICA-Y-C8 de 25 para 37°C.....	67
Figura 4-21 Cinética de dessorção de Lisozima em Suporte PURIFICA-Y-C1.....	68
Figura 4-22 Cinética de dessorção de Lisozima em Suporte PURIFICA-Y-C8.....	69
Figura 4-23 Cinética de dessorção de Lisozima em Suporte Octil-agarose .....	69
Figura 4-24 Isotermas de dessorção de Lisozima dos suportes hidrofóbicos PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose. Força iônica 25mM pH7, a 25°C 50 rpm e 16h.....	72
Figura 4-25 Cinética de adsorção de Lisozima em sílica pura pH 3 e 7 .....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1 Isolação da penicilina amidase de E. coli (10kg).....	12
Tabela 3-1 Caracterização suportes de sílica Kopp Technologies.....	26
Tabela 4-1 Rendimentos de adsorção obtidos pelos dois protocolos diferentes de hidratação do suporte. Proporção 1:24 (m/v). Carga protéica (15 mg/g); Volume de solução=6 mL; massa de suporte=0,25g, $C_{prot0}=0,625$ mg/ml; 25°C, durante 16h; 50 rpm.....	35
Tabela 4-2 Concentrações iniciais e finais de enzima (UTBU/mL) e de proteínas (mg/L) na adsorção de Lipase BTL-2 em suportes PURIFICA-Y-C1, C8 e Octil-agarose, e respectivas massas de suporte utilizadas (gsólido). Razão suporte/ solução = 1:10 m/v, $C_{prot0}= 0,551$ mg/mL, $C_{enz0}= 65,42$ UTBU/mL, T= 25°C, tampão fosfato 5mM pH7,5, durante 16 horas; Volume de solução = 8 mL. ....	43
Tabela 4-3 Rendimentos em enzima e proteína (%) e atividades específicas iniciais e finais na adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos.....	44
Tabela 4-4 Concentrações iniciais e finais de proteínas (mg/mL) na adsorção de Lisozima em suportes PURIFICA-Y-C1, C8 e Octil-agarose, e respectivas massas de suporte utilizadas (gsólido). Razão suporte/ solução = 1:10 m/v, T= 25°C, tampão fosfato 25mM pH7, durante 16 horas; Volume de solução=5mL.....	45
Tabela 4-5 . Rendimentos em proteína (%) na adsorção de lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos. ....	45
Tabela 4-6 Concentrações finais de enzima (TBU/L) e de proteínas (mg/L) no sobrenadante de dessorção de Lipase BTL-2 em suportes PURIFICA-Y-C1, C8 e Octil-agarose, e respectivas massas de suporte utilizadas nessa etapa (gsólido). Razão suporte/ solução = 1:10 m/v, T= 25°C, tampão fosfato 5mM pH7, 1% Triton X-100; durante 16 horas. ....	55
Tabela 4-7. Rendimentos em enzima e proteína (%) e atividades específicas iniciais e finais na dessorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos utilizando Triton-X-100 1% (m/v), tampão fosfato de sódio pH7 (5mM) na proporção de 1:10 m/v sob agitação a 50 rpm, 25°C por 16h.....	55
Tabela 4-8 Parâmetros das retas obtidas pelo ajuste das isoterms de dessorção de BTL-2 dos suportes hidrofóbicos.....	57
Tabela 4-9 Rendimentos em enzima e proteína (%) e atividades específicas iniciais e finais na dessorção de BTL-2 em diferentes suportes utilizando Triton-X-100 1% (m/v),	

tampão fosfato de sódio pH7 (5mM) na proporção de 1:10 m/v sob agitação a 50 rpm, 25°C por 16h.....	66
Tabela 4-10 Concentrações finais de proteínas (mg/L) no sobrenadante de dessorção de lisozima em suportes PURIFICA-Y-C1, C8 e Octil-agarose, e respectivas massas de suporte utilizadas nessa etapa ( $g_{sólido}$ ). Razão suporte/ solução = 1:200 m/v, T= 25°C, tampão fosfato 25mM pH7, 1% Triton X-100; durante 16 horas.....	70
Tabela 4-11 Rendimentos de dessorção em proteína (%) de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos utilizando Triton-X-100 1% (m/v), tampão fosfato de sódio pH7 (25mM) na proporção de 1:200 m/v sob agitação a 50 rpm, 25°C por 16h. ....	71
Tabela 4-12 Parâmetros das retas obtidas pelo ajuste das isotermas de dessorção de Lisozima dos suportes hidrofóbicos .....	72
Tabela 4-13 Variação da força iônica para os pHs 3 e 7. Razão de dessorção (m/v) <b>1:10</b> ; 25°C; 50rpm; durante 16h; 1% de Triton X-100.....	75
Tabela 4-14. Variação da força iônica para os pHs 3 e 7. Razão de dessorção (m/v) <b>1:200</b> ; 25°C; 50rpm; durante 16h; 1% de Triton X-100. Suporte PURUFICA-Y-C8. ....	76

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
2.1	Proteínas: Enzimas	5
2.2	Lipases	5
2.3	Lipase BTL-2	7
2.4	Lisozima	9
2.5	Purificação de produtos biotecnológicos e adsorção hidrofóbica	10
2.5.1	Adsorção física	13
2.5.2	Adsorção por interação hidrofóbica	18
2.5.3	Adsorventes	19
2.5.4	Adsorção hidrofóbica de lipases	19
2.5.5	Suportes hidrofóbicos: sílica, agarose e efeitos de superfície	20
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1	Materiais	25
3.1.1	Enzima BTL-2	25
3.1.2	Enzima Lisozima	25
3.1.3	Suportes	25
3.1.4	Reagentes, sais, solventes.	26
3.2	Métodos analíticos	26
3.2.1	Medida de atividade: Hidrólise da Tributirina	26
3.2.2	Determinação de proteínas totais	27
3.3	Procedimentos experimentais	27
3.3.1	Obtenção do extrato enzimático de BTL-2	27
3.3.2	Estudo da influência da etapa de hidratação dos suportes hidrofóbicos	27

3.3.3	Adsorção de BTL-2 e Lisozima em suportes hidrofóbicos com diferentes grupos funcionais.	28
3.3.4	Cálculo de rendimento de adsorção	29
3.3.5	Cinética de adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos	30
3.3.6	Cinética de adsorção de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos	30
3.3.7	Cinética de dessorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos	31
3.3.8	Cinética de dessorção de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos	31
3.3.9	Dessorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos	31
3.3.10	Cálculo de rendimento de dessorção	32
3.3.11	Obtenção das isotermas de dessorção	32
3.3.12	Adsorção de lisozima em sílica pura pH 3 e 7	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Influência do protocolo de hidratação no desempenho dos suportes hidrofóbicos</b>	<b>35</b>
4.1.1	Umidade em base úmida (%) em função do tempo para os diferentes suportes hidrofóbicos.	36
<b>4.2</b>	<b>Adsorção</b>	<b>39</b>
4.2.1	Cinéticas de adsorção de BTL-2 em PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose.	39
4.2.2	Cinéticas de adsorção de Lisozima em PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose.	41
4.2.3	Adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos	43
4.2.4	Adsorção de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos	45
<b>4.3</b>	<b>Dessorção de BTL-2 de suportes hidrofóbicos PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 E OCTIL-AGAROSE</b>	<b>46</b>
4.3.1	Cinéticas de dessorção de BTL-2 em PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose.	52
4.3.2	Dessorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos	54
4.3.3	Isotermas de dessorção	56
4.3.4	Influência da razão de lavagem no rendimento de dessorção	61

4.3.5	Sumário das discussões obtidas da dessorção de BTL-2 com derivado obtido a partir de extrato e implicações sobre o material	64
4.3.6	Ensaio preliminar suporte sílica-DIOL	65
4.3.7	Efeito da temperatura na dessorção do suporte PURIFICA-Y-C8	67
4.3.8	Cinéticas de dessorção de Lisozima em PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose.	68
4.3.9	Dessorção de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos	70
4.3.10	Isotermas de dessorção Lisozima	71
<b>4.4</b>	<b>Influência do pH e força iônica na adsorção e dessorção de Lisozima de PURIFICA-Y-C8</b>	<b>73</b>
4.4.1	Adsorção de lisozima em sílica pura pHs 3 e 7	73
4.4.2	Influência da força iônica na dessorção de Lisozima de PURIFICA-Y-C8	75
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>81</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos que possuem diversas aplicações, representando perspectivas de uso interessantes para diversos ramos da indústria, entre eles agroindústria, biocombustíveis e farmacêutica.

Dentre as biomoléculas de interesse biotecnológico, as enzimas estão entre as de maior valor agregado. Reações catalisadas por enzimas geralmente ocorrem sob condições relativamente suaves, como temperatura próxima à ambiente e pH próximo ao neutro. Além disso, apresentam alta especificidade, quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade. Deste modo, esses biocatalisadores mostram-se como alternativas interessantes à vários processos tradicionais que exigem condições severas em sistemas reacionais.

A recuperação de enzimas do caldo de cultivo costuma ser a etapa mais cara de um processo de produção, pois estão presentes em baixa concentração em uma mistura complexa de moléculas, o que inclui proteínas de diferentes tamanhos e conformações. Assim, é crucial usar processos de purificação adequados (seletivos, eficientes, baratos) para separar essas biomoléculas valiosas em extratos complexos (Suwal, Doyen e Bazinet, 2015).

A maioria dos processos para purificação de biomoléculas encontra muitas dificuldades do ponto de vista técnico, exigindo um elevado número de etapas, desde: 1) a separação entre microrganismo e o caldo de cultivo (filtração, centrifugação, separação por membranas); 2) rompimento celular (homogeneização, ultrassom, etc.) e separação dos debris (centrifugação, filtração em membranas, etc.) se a enzima foi produzida intracelularmente; 3) concentração da enzima (adsorção, precipitação, extração com solventes, ultra filtração com membranas, etc.); e 4) purificação de alta resolução (cromatografia, eletroforese, etc.), o que resulta em alto custo, já que cada etapa utilizada, uma parte das moléculas presentes é perdida. Assim, quanto maior o número de etapas necessárias mais alto o custo final da separação. A redução de etapas para minimização dessas perdas é, pois, importante para minimizar os custos, de modo que o número de etapas utilizado é uma solução de compromisso entre o rendimento obtido e o grau de pureza desejado (Pessoa e Kilikian, 2005).

A adsorção é uma operação unitária amplamente empregada em processos biotecnológicos, pois quando a eficiência energética, seletividade e custo são

considerados, ela se mostra muito promissora (Lee *et al.*, 2004). Ela se baseia na maior afinidade que um determinada molécula tem por um dado adsorvente em relação ao meio em que ela se encontra, da mesma forma que ocorre na extração líquido-líquido. A adsorção, por isso, é também conhecida como extração em fase sólida. O tipo de interação entre o adsorvente e o adsorbato pode ser iônica, com o adsorvente tendo carga oposta à da molécula a ser adsorvida, hidrofóbica, quando o adsorvente e a molécula possuem alta hidrofobicidade ou ainda mista, quando ocorre os dois efeitos.

Lipases são enzimas com uma característica peculiar, elas possuem alta hidrofobicidade. Embora sejam como todas as enzimas, majoritariamente hidrofílicas, pois são produzidas no citoplasma aquoso das células, ela possui regiões altamente hidrofóbicas na sua superfície. Isso decorre do fato delas terem sido conformadas para atuarem na interface entre a fase hidrofóbica, onde fica o substrato hidrofóbico (triglicerídeos) e a fase hidrofílica, onde fica a enzima, molécula solúvel em água. O trecho hidrofóbico é necessário para a ligação entre a enzima e o substrato. Decorrente dessa propriedade, a adsorção de lipases utilizando adsorventes hidrofóbicos permite adsorver de forma seletiva essas enzimas, aliando concentração e purificação na mesma etapa. Assim, se adsorção já é amplamente utilizada para separação de biomoléculas, no caso particular de adsorção hidrofóbica de lipases, sua utilização é ainda mais promissora, pois será também seletiva.

Polímeros inertes e materiais inorgânicos são potencialmente adequados para a imobilização e purificação enzimática por adsorção física. Além de ser acessível, uma matriz ideal deve abranger características como insolubilidade em água, resistência mecânica e química sob as condições operacionais, alta área superficial, reatividade a agentes funcionalizantes e preferencialmente baixo custo. Silicatos, borossilicatos e aluminossilicatos, alumina e outros óxidos, são alguns dos materiais utilizados na adsorção de enzimas em suportes inorgânicos.

A sílica é um dos materiais inorgânicos inertes mais utilizados devido a características como: estabilidade química, estrutura porosa, permeabilidade seletiva de tamanho (dependendo da distribuição de poros do material) e biocompatibilidade. Além disso, devido à existência de grupos silanol na superfície do material (Si-OH), é possível a ativação com vários grupos funcionais sem muitas etapas de processamento (Zucca e Sanjust, 2014).

Tendo em vista as vantagens da adsorção hidrofóbica em processos de processos de purificação enzimática, o objetivo desse estudo foi avaliar a performance de diferentes materiais adsorventes com grupos funcionais hidrofóbicos distintos na dessorção de lipases por meio do uso de isotermas de dessorção que permitiram a avaliação do grau de hidrofobicidade dos diferentes suportes, além do melhor entendimento da interação enzima-sólido e consequente avaliação das potenciais aplicações dos materiais utilizados. Neste trabalho, foram avaliadas a adsorção e dessorção (cinética e isoterma) de lipase *Bacillus thermocatenulatus* (BTL-2) recombinante, em sílica e agarose funcionalizadas. Visando a avaliar a influência do grau de pureza da enzima e do seu tamanho no desempenho dos suportes, foi também testada a adsorção da enzima Lisozima (LYS), uma proteína com tamanho menor que BTL2 e com alto grau de pureza.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Proteínas: Enzimas

Todas as enzimas são proteínas, exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA, e são, portanto, constituídas por aminoácidos. As enzimas, têm pesos moleculares variando de cerca de 12.000 a mais de um milhão de daltons (Da) e a atividade catalítica depende da integridade das suas conformações. Se uma enzima for desnaturada ou dissociada nas suas subunidades, geralmente a atividade catalítica é perdida, mesmo se mantida a estrutura primária. Então, as estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para a atividade catalítica (LEHNINGER et al., 2002).

As enzimas são divididas em seis classes principais pelas reações que catalisam, segundo a Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)(Sabel, 2006). Podem ser: **1) Oxido-redutases (reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons); 2) Transferases (transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil); 3) Hidrolases (reações de hidrólise de ligação covalente); 4) Liases (catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico); 5) Isomerases (reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos); e 6) Ligases (catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre com consumo de energia).**

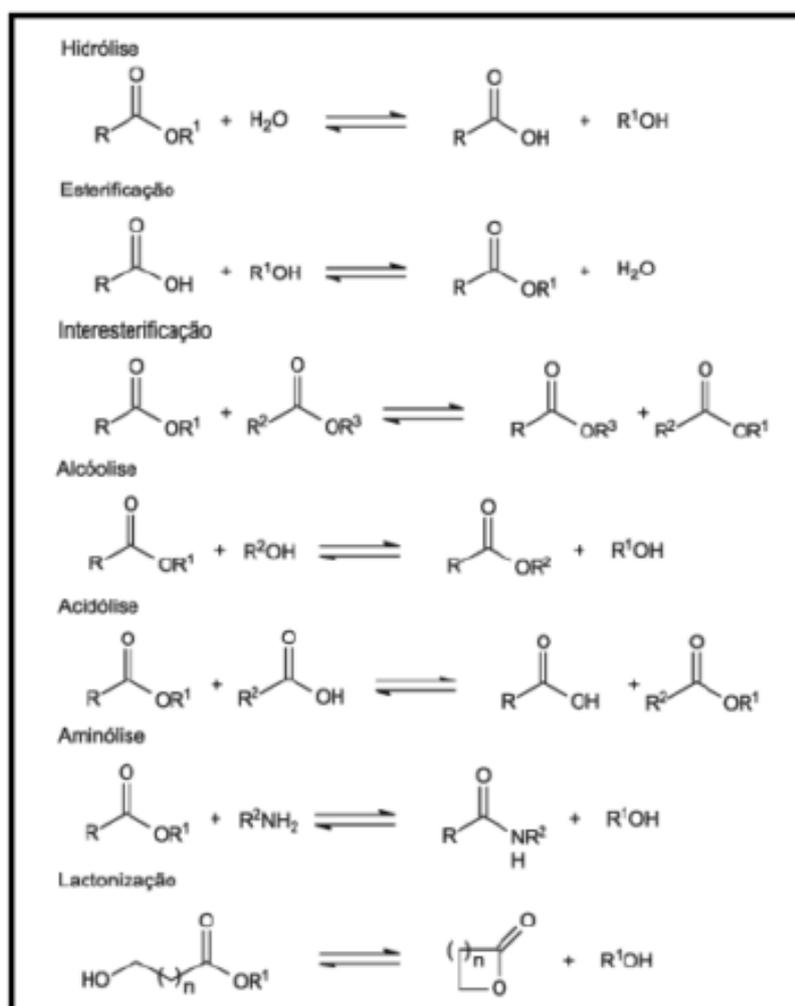
### 2.2 Lipases

As enzimas lipases (triacilglicerol lipase EC3.1.1.3) pertencem à família das serinas hidrolases, amplamente utilizadas na biocatálise devido à sua grande especificidade de substrato, alta enantio e regioseletividade além de possuírem capacidade de catalisar diferentes reações em meio orgânico, tais como, síntese de ésteres, modificação de triacilgliceróis e fosfolipídios, enriquecimento de ácidos graxos, resolução de enantiômeros, produção de biodiesel, acilação de

carboidratos e compostos bioativos (Adlercreutz, 2013; Palomo, M. *et al.*, 2002; Reetz, 2002).

Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações triplas de ésteres, enquanto esterases atuam sobre um único tipo de ligação éster, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular (BIER, 1955; BROCKMAN, 1984 apud Messias *et al.*, 2011). Dependendo das condições, as lipases também catalisam reações de síntese (MAHADIK *et al.*, 2002; JAEGER; EGGERT, 2002; SAXENA *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2009 apud Messias *et al.*, 2011), como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular). A Figura 2.1 traz as reações catalisadas por lipases.

Figura 2-1 Reações catalisadas por lipases



Fonte: (Paques e Macedo, 2006)

Alguns exemplos de aplicações das lipases incluem (Sharma, Chisti e Chand, 2011):

- Pesquisa e desenvolvimento (ferramentas de pesquisa para hidrólise, síntese, análise, biotransformações e separações por afinidade);
- Aplicações cosméticas (preparações para pele; limpadores de dentaduras);
- Diagnóstico médico e análises químicas (glicose no sangue, ureia, colesterol; Sistemas de ELISA; eletrodos enzimáticos e kits de ensaio);
- Aplicações terapêuticas (como agentes antitrombóticos, tratamentos antitumorais, anti-inflamatórios, auxiliares digestivos, entre outros);
- Catálise industrial em sínteses especiais (fabricação de cerveja e vinificação; processamento de laticínios; processamento de frutas, carne e vegetais, modificações de amido; processamento de couro, fabricação de celulose e papel; processamento de açúcar e confeitaria, produção de frutose, detergentes e agentes de limpeza, síntese de aminoácidos e produtos químicos a granel, entre outras).

### 2.3 Lipase BTL-2

A lipase BTL-2 de *Bacillus thermocatenuatus* é uma proteína de 43 kDa, ponto isoelétrico de 7,2, que apresenta alta estabilidade a temperaturas médias (50 °C), pH alcalino (9,0–11,0) e em solventes orgânicos (2-propanol, acetona, metanol). Apresenta alta especificidade para substratos muito diferentes, com grande seletividade na resolução enantiomérica de intermediários-chave para síntese de fármacos.

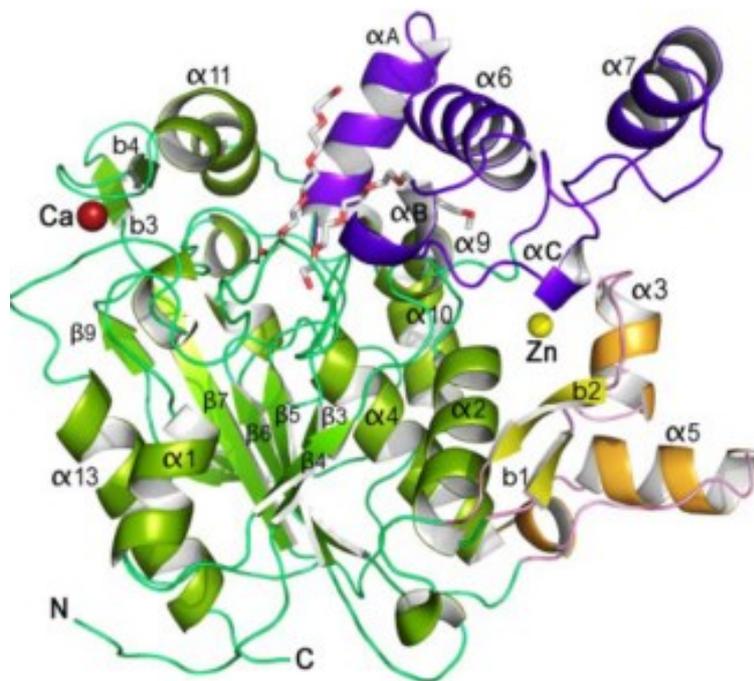
As lipases termoalquilofílicas bacterianas que hidrolisam ácidos graxos saturados a 60-75 °C e pH 8-10 são agrupadas como família lipase I.5, caracterizada por seus tamanhos moleculares significativamente maiores (40-45 kDa) em relação a outras lipases microbianas (geralmente abaixo de 35 kDa).

A ativação enzimática dessa lipase envolve grandes rearranjos estruturais de cerca de 70 aminoácidos e o movimento combinado de duas tampas. Estas

alterações estruturais são estabilizadas pelo domínio de ligação ao  $Zn^{2+}$ , que é característico desta família de lipases. As estruturas exibem um sítio de ligação ao zinco em um domínio extra, responsável pelo maior tamanho molecular das enzimas da família I.5 em comparação com outras lipases microbianas (Carrasco-López et al., 2009).

Na Figura 2.2 está mostrada a estrutura da conformação aberta da BTL2 com diferentes domínios coloridos: ( $\alpha/\beta$ ) núcleos de hidrolase, verde; domínio cap (resíduos 169-239), púrpura; e o domínio extra do íon de zinco, amarelo. Elementos de estrutura secundária são classificados. Os íons metálicos ( $Zn^{2+}$ , amarelo;  $Ca^{2+}$ , vermelho escuro) estão representados em esferas. Duas moléculas de detergente Triton X-100 no sítio ativo são mostradas como bastões, já que é comum sua utilização na dessorção da proteína durante processo de purificação.

Figura 2-2. Estrutura da conformação aberta da BTL2.



Fonte: (Carrasco-López et al., 2009)

A serina catalítica está no padrão Ala-X-Ser-X-Gly característico das lipases termoalquilofílicas enquanto Gly-X-Ser-X-Gly é o padrão da maioria das lipases e proteases de serina. Na conformação aberta, a serina catalítica é exposta a solvente e substrato.

A elevada hidrofobicidade desta enzima deve-se ao fato de sua ativação envolver grandes rearranjos estruturais de cerca de 70 aminoácidos, o movimento combinado de duas tampas e a criação de uma grande cavidade hidrofóbica. Além disso, a ativação causa a hiperexposição de dez cadeias laterais aromáticas (Phe-28, Phe-177, Phe-181, Phe-182, Tyr-200, Tyr-205, Phe-207, Phe-222, Phe-226 e Phe-299) (Carrasco-López *et al.*, 2009).

Devido a essa peculiaridade de lipases, resultante de trechos altamente hidrofóbicos, esse tipo de enzima possui alta afinidade por suportes hidrofóbicos, justificando os diversos estudos relatados na literatura para a adsorção hidrofóbica de lipases em diferentes materiais, visando sua imobilização ou purificação (Fernández-Lorente *et al.*, 2005; Sabuquillo *et al.*, 1998; Jesionowski *et al.*, 2014; Bastida *et al.*, 1998; Zhao, Peng e Zhou, 2015; Palomo *et al.*, 2002; Lima, de *et al.*, 2016; Palomo, Jose M. *et al.*, 2004).

## 2.4 Lisozima

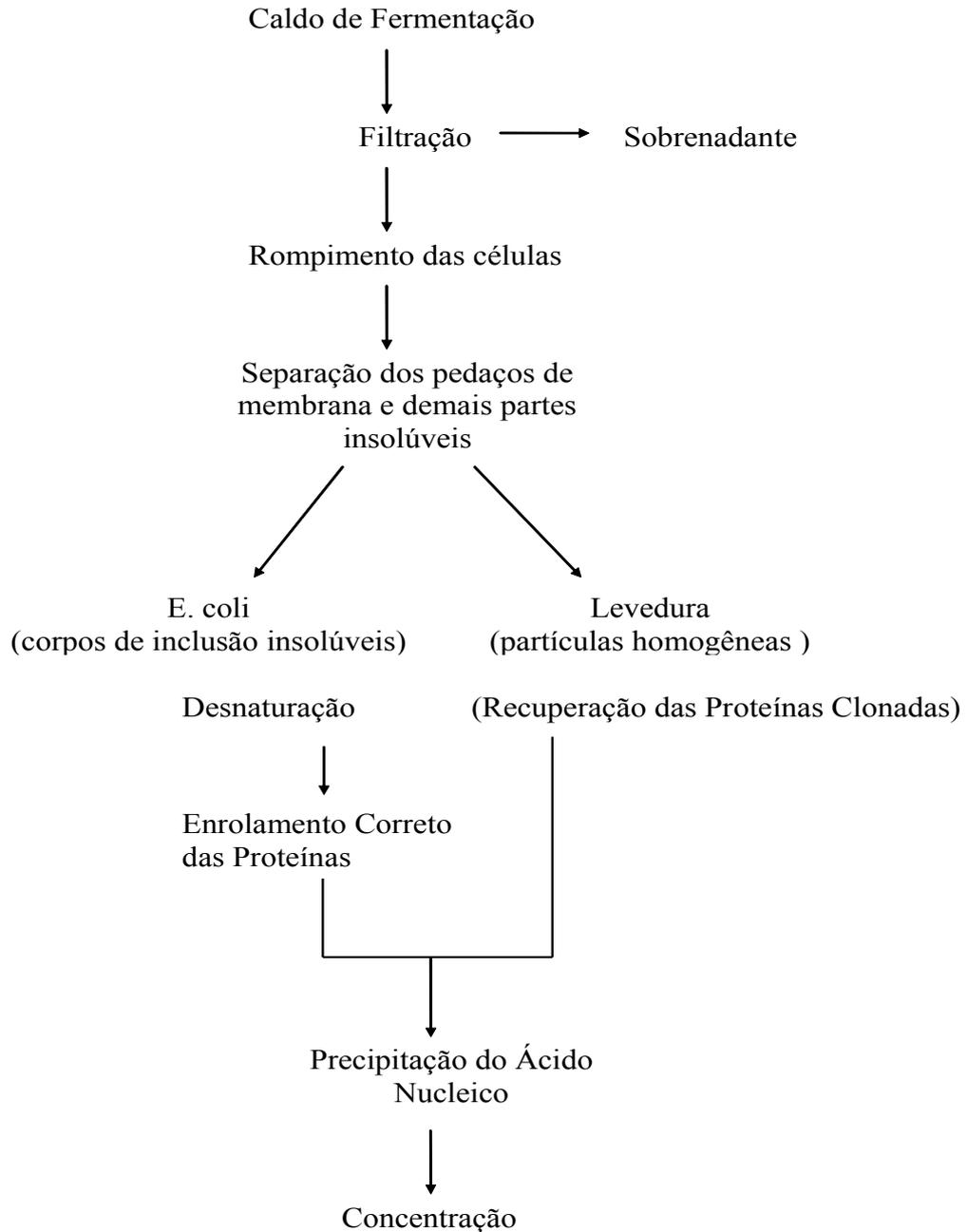
A lisozima (N-acetilmuramida glicohidrolase, (EC 3.2.1.17) é uma das hidrolases melhor caracterizadas. Pode ser encontrada em uma variedade de células e secreções de vertebrados, como baço, leite, lágrimas e clara de ovo, sendo comercialmente valiosa para diferentes aplicações, como por exemplo, aditivo alimentar em produtos lácteos, agente disruptor de células para extração de produtos bacterianos intracelulares, componente de preparações oftalmológicas e como medicamento para o tratamento de úlceras e infecções (Ghosh, Silva e Cui, 2000).

A lisozima utilizada nesse trabalho ocorre naturalmente em clara de ovo de galinha. Do ponto de vista químico, é uma proteína globular, que consiste em 129 resíduos, é considerada uma biomolécula modelo pequena com um peso molecular de 14,4 kDa, com as dimensões de 30 x 30 x 45 Å. Ela apresenta forma elipsóide que é estabilizada por quatro pontes dissulfeto e seu sítio ativo pode se ligar a seis resíduos de carboidratos para executar a sua função de catalisador. Seu pH isoelétrico é de aproximadamente 11 (Katiyar *et al.*, 2005; Bhattacharyya *et al.*, 2010).

## 2.5 Purificação de produtos biotecnológicos e adsorção hidrofóbica

A recuperação de produtos biotecnológicos envolve um grande número de etapas, utilizando várias operações unitárias. A primeira etapa é a separação entre microrganismo e caldo de cultivo. Se o produto é extracelular, a recuperação passa a seguir com o sobrenadante. Se o produto é intracelular, como ocorre com BTL-2 produzida em *E. coli* recombinante, é a fração sólida que é conservada. A retirada da enzima intracelular ativa aumenta o número de etapa, onerando ainda mais a recuperação de enzima em relação a uma naturalmente secretada para o meio pelo microrganismo. Na figura 2.3 se apresenta uma sequência típica para a separação de proteínas recombinantes intracelulares, no caso mais complexo, onde ocorre agregação das moléculas de enzima produzida intracelularmente, devido à alta concentração delas. Nesse caso, após rompimento e separação dos debris é necessária separação dessas moléculas por método que desestruturam a enzima, requerendo posterior enrolamento das moléculas para obtenção de enzima ativa com alto rendimento.

Figura 2-3 Subprocessos de recuperação do produto intracelular



Fonte: (LESER e ASENJO,1992).

A seguir, são utilizadas operações unitárias de concentração do produto no sobrenadante onde se encontra o produto, tais como ultra filtração, precipitação com sais, polímeros ou solvente e adsorção. Essas operações visam principalmente concentrar o produto, sendo que a posterior etapa de purificação para obtenção de alta pureza irá requer operações mais sofisticadas como cromatografia e eletroforese. A Tabela 2.1 mostra um exemplo das operações

utilizadas e respectivas perdas durante a purificação de penicilina G acilase ou amidase (PGA) obtida intracelularmente (Balasingham *et al.*, 1972).

Tabela 2-1 Isolação da penicilina amidase de *E. coli* (10kg)

<b>Material</b>	<b>Vol. (l)</b>	<b>Cp (mg/ml)</b>	<b>Aet * 10<sup>-5</sup> (UI)</b>	<b>Ae (UI/mg)</b>	<b>R (%)</b>
Suspensão rompida	50	28,4	1,32	0,093	100
Extrato (depois da remoção das membranas)	42	31,4	1,16	0,088	88
Sobrenadante <sup>a</sup>	42	19,2	0,87	0,108	66
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> (redissolvido)	<b>ppt.</b> 6,0	45	0,71	0,26	54
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> (redissolvido)	<b>ppt.</b> 1,0	45	0,150	0,33	54 <sup>b</sup>
Polietilenoglicol (redissolvido)	ppt. 0,25	76	0,181	0,95	65
Solução dialisada	0,25	62	0,114	0,73	41
Coletado no fracionamento em coluna DEAE-celulose	0,24	4,4	0,067	6,35	25

Fonte: (Balasingham *et al.*, 1972)

<sup>a</sup> Depois da precipitação com sulfato de estreptomicina, para que ocorra a precipitação dos ácidos nucleicos.

<sup>b</sup> Não é uma etapa de concentração/purificação, apenas ocorre mudança no método da medida de atividade, que é feito com PDAB (paradimetilaminobenzaldeído).

Após purificação do produto no grau desejado, restam ainda operações de polimento, tipo adição de moléculas protetoras da estrutura terciária se o produto são enzimas, e cristalização ou liofilização, com ou sem aditivos, se o produto é para ser obtido na forma sólida.

### 2.5.1 Adsorção física

Operações de adsorção que empregam resinas sintéticas ou matrizes sólidas inorgânicas são amplamente utilizadas em escala laboratorial e também encontram aplicações industriais.

O processo de adsorção é uma operação que envolve a interação de uma substância de uma fase (gasosa ou líquida) com a superfície de um sólido. A espécie química adsorvida é chamada adsorbato (ou sorbato), enquanto a fase sólida onde a mesma é adsorvida é chamada adsorvente.

Um processo típico de adsorção envolve quatro etapas. Na primeira, uma solução de alimentação é adicionada ao adsorvente. Na segunda etapa, ocorre a adsorção, um processo que pode ser lento e seletivo. A terceira, a solução alimentada é retirada. E na última etapa, o soluto adsorvido é eluído, geralmente utilizando-se um solvente diferente.

Adsorção e extração são processos concorrentes para isolar solutos a partir de soluções diluídas. A adsorção tende a ter uma menor capacidade (massa do componente por volume de fase para separação), mas maior seletividade. A adsorção pode também oferecer separação com menores perdas de atividade específica que a extração: as proteínas podem ser adsorvidas sem a desnaturação.

O processo de adsorção em coluna envolve o equilíbrio e condições de transporte de massa. A junção de condições dinâmicas e de equilíbrio é fundamental para a modelagem do processo, que geralmente é desenvolvido de modo empírico (Mollerup, 2008).

A adsorção em batelada, da mesma forma que ocorre numa extração, depende de duas restrições básicas: a de equilíbrio e a do balanço de massa. O balanço de massa é dado por

$$C_i V_L + q_i m = C_f V_L + q_f m \quad (2.1)$$

Onde

$C_i$  e  $C_f$  são as concentrações inicial e final em solução,  $q_f$  e  $q_i$  são as concentrações final e inicial sobre o adsorvente,  $V_L$  é o volume de alimentação e  $m$  é a quantidade de adsorvente. Esta equação é facilmente montada da seguinte maneira:

$$q_f = q_I + \frac{V_L}{m} (C_I - C_f) \quad (2.2)$$

Como ocorre na extração, esta “linha de operação” é linear, ou seja, especificada a concentração inicial, ela representa uma reta no plano  $q_f \times C_f$ .

O encontro entre a reta da equação **2.2** com a curva de equilíbrio define a condição de distribuição limite do adsorbato e pode ser encontrada graficamente ou numericamente. Na dessorção, ocorre o processo inverso, aplicando-se equacionamento similar, conforme será mostrado em detalhes no capítulo 4.

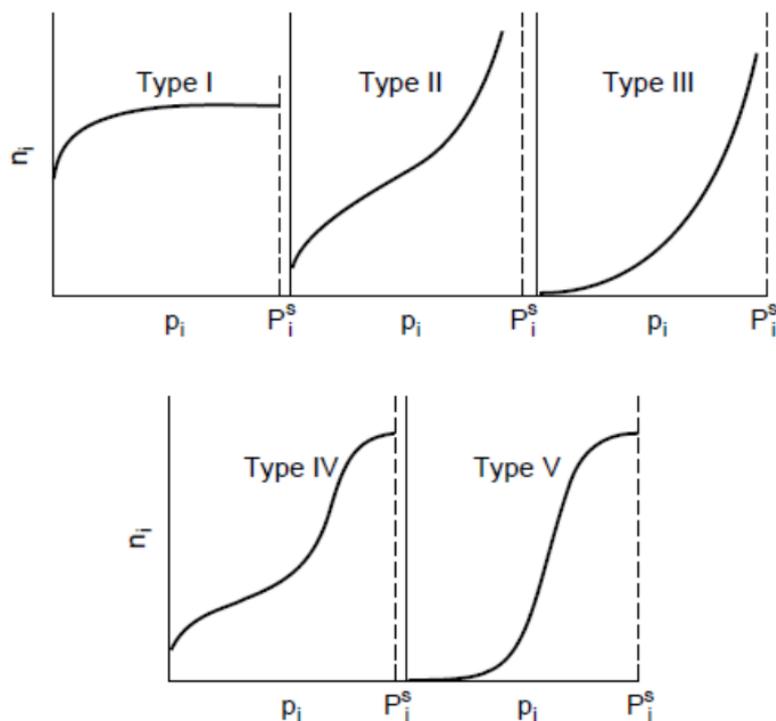
De todo o modo, a relação de equilíbrio é fundamental, tanto para o processo em coluna, como no caso em batelada. Além disso, a avaliação das condições de equilíbrio oferece uma análise comparativa prática entre as vantagens do uso de diferentes adsorventes para um processo de separação tendo como referência o adsorbato desejado.

A adsorção de uma substância de uma fase à superfície de outra em um sistema específico alcança o equilíbrio para uma dada temperatura quando há uma distribuição estável entre as fases. Assim, passado tempo suficiente, a concentração de substância torna-se constante em solução. O equilíbrio é representado pela concentração da substância adsorvida ( $q_e$ ) em função da concentração residual de equilíbrio (em solução,  $C_e$ ). Não há um padrão específico para definição exata dessas concentrações. (Guiochon et al. 2006) reportam que são comuns as definições de  $q_e$  e  $C_e$  ambos em base volumétrica (massa de soluto por volume de fase considerada), mas também a definição de  $q_e$  em base mássica (massa do adsorbato por massa de adsorvente); descaracterizando uma razão adimensional entre  $q_e$  e  $C_e$ . Outras definições ainda envolvem a concentração  $q_e$  por unidade de área de adsorvente (Guiochon et al., 2006) ou mesmo por unidade de volume de poros e não volume de sólido (como em (Mollerup, 2008).

De todo modo,  $q_e = q_e(C_e)$  representa uma expressão comumente denominada isoterma de adsorção, cujas concentrações de equilíbrio entre as fases são obtidas à temperatura constante.

Os fundamentos termodinâmicos para as isotermas de equilíbrio gás-sólido se encontram bem desenvolvidos. Essencialmente são cinco classes baseadas na forma da isoterma (Figura 2.4).

Figura 2-4 Representação dos tipos de isotermas.

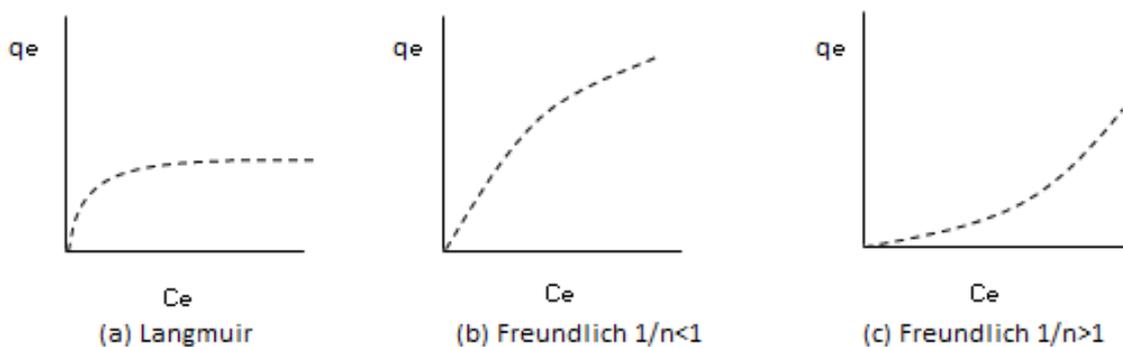


Fonte: Guiochon et al., 2006

A caracterização de tais isotermas encontra diversas aplicações, como o uso de adsorção de nitrogênio puro para caracterização de superfície de materiais, de onde pode ser estimada a estrutura de poros, área superficial do sólido (BET), entre outros parâmetros (Zhao et al., 2013). Isotermas do tipo I são as mais comuns (Guiochon et al., 2006), correspondem a um trecho de aproximação linear em baixas concentrações e curvatura em altas, representando processo de saturação. As isotermas tipo II e III possuem assíntota vertical, correspondente à pressão de vapor da fase gasosa nas condições de poro. Deste modo, o comportamento é explicado pela condensação capilar. As isotermas do tipo IV e V indicam a existência de poros pequenos, que ficam preenchidos após a formação de múltiplas camadas de adsorção.

Variações dos três tipos principais de adsorção, representados pelas isotermas da Figura 2.5, têm sido obtidas por meio do desenvolvimento de diversos modelos de equilíbrio que descrevem relações de isotermas. Modelos clássicos incluem o modelo de Langmuir e de Freundlich. A Figura 2.5 apresenta um esboço da resposta destes modelos.

Figura 2-5 Representação gráfica de modelos clássicos de isotermas.



Fonte: Adaptado de (SLEJKO, 1985).

A forma funcional da isoterma de Freundlich segue:

$$q = aC^{1/n} \quad (2.3)$$

Destacando o caráter não linear do equilíbrio.

Deduções e detalhamentos da termodinâmica do processo de adsorção gasosa fogem do escopo da presente dissertação, maiores informações podem ser encontradas em Ruthven (1984).

No caso da adsorção líquido-sólido, não há correspondentes aos comportamentos do tipo II e III e é menos usual a formação de camadas além da monocamada. De modo geral, o comportamento associado costuma possuir a forma apresentada para adsorção gás-sólido na curva tipo I (Guiochon et al., 2006).

A maior parte do conhecimento sobre o equilíbrio líquido-sólido permanece sendo de ordem empírica, devido à maior complexidade do fenômeno (Guiochon et al., 2006). Com relação à complexidade, vale destacar que a adsorção líquido-sólido sempre é competitiva, uma vez que o adsorbato precisa competir pelo menos com o próprio solvente por acesso à superfície.

Guiochon et al. (2006) indicaram que a isoterma de Langmuir costuma ser a primeira escolha de equação para modelagem de dados de equilíbrio em processos de adsorção líquido-sólido. A isoterma de Freundlich também teve sua aplicação estendida para o caso líquido. Guiochon et al. (2006) destacaram o papel relevante da isoterma para o equilíbrio em casos de adsorbatos polares em

adsorventes polares e que tem sido assim adequada para ajuste de dados experimentais de certas proteínas em adsorventes para troca iônica.

Guiochon et al. (2006) apresentam uma explanação aprofundada sobre o tema, com várias citações de referências relevantes e deduções de isotermas por via cinética, mas que foge do escopo da presente dissertação, já que a baixa concentração de adsorbato utilizada nos ensaios permitiu a aproximação linear adequada aos dados de equilíbrio em todos os casos analisados.

Conforme já mencionado, o processo de adsorção ocorre através do transporte de massa da fase fluída para o material sólido, geralmente poroso. Portanto, o processo de adsorção (cinética e equilíbrio) é influenciado por vários fatores; tanto relacionados à estrutura sólida, como do próprio adsorbato. Propriedades do adsorvente incluem composição da superfície sólida e polaridade da mesma; distribuição de tamanho de partícula e área superficial específica. Propriedades do adsorbato incluem o tamanho da proteína e suas características de carga e polaridade.

As interações que atuam na adsorção física têm impacto direto no equilíbrio do processo de adsorção e envolvem forças de Van der Waals e eletrostáticas (Ruthven, 1984; Guiochon et al., 2006).

Na cromatografia, a interação entre a fase sólida e várias moléculas diferentes presentes na fase líquida é diferente, o que permite a separação por eluição em diferentes tempos de residência. A cromatografia costuma ser dividida em três tipos fundamentais: por exclusão de tamanho (filtração gel), troca iônica ou por afinidade (Burgess & Deutscher, 2009).

No caso da cromatografia por exclusão de tamanho, efeitos de interação entre superfície e componentes em solução não costumam ser relevantes. O processo de separação decorre pelo próprio transporte de massa no sistema, que usa particulado de poros com tamanho apropriado para garantir resolução. A cromatografia de troca iônica, em contrapartida, faz uso do processo de adsorção iônica, entre partículas carregadas e o adsorvente, que pode proporcionar troca de ânions ou cátions, dependendo das necessidades de purificação associadas às condições de operação.

A cromatografia de afinidade utiliza a afinidade específica de biomoléculas por certos sítios ativos, que costumam envolver adsorção química.

Particularmente, a adsorção hidrofóbica como meio de separação costuma ser tratada como interação aplicada à cromatografia por adsorção (ou interação) hidrofóbica, um caso particular de coluna. A adsorção hidrofóbica envolve a ação de forças de van der Waals, relativamente fracas e o fato de que a molécula do adsorbato possui afinidade reduzida pela fase aquosa. Geralmente o processo é mais útil quando há diferença marcante de hidrofobicidade entre distintas proteínas em solução, levando à maior seletividade.

### 2.5.2 Adsorção por interação hidrofóbica

Proteínas apresentam regiões polares e apolares, cujas interações apolares entre aminoácidos hidrofóbicos auxiliam na estabilização das estruturas tridimensionais. Essas atrações são fracas e denominadas de interações de van der Waals, também conhecidas como forças de London.

Dentre os aminoácidos apolares destacam-se a alanina, glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina, triptofano, tirosina. O que incluem aminoácidos alifáticos e aromáticos. A fenilalanina é consideravelmente a mais apolar entre os aminoácidos de cadeia lateral aromática. A glicina é classificada como apolar e alifática, apesar de pouco contribuir de fato para hidrofobicidade da proteína quando seu resíduo se faz presente (LEHNINGER et al., 2002).

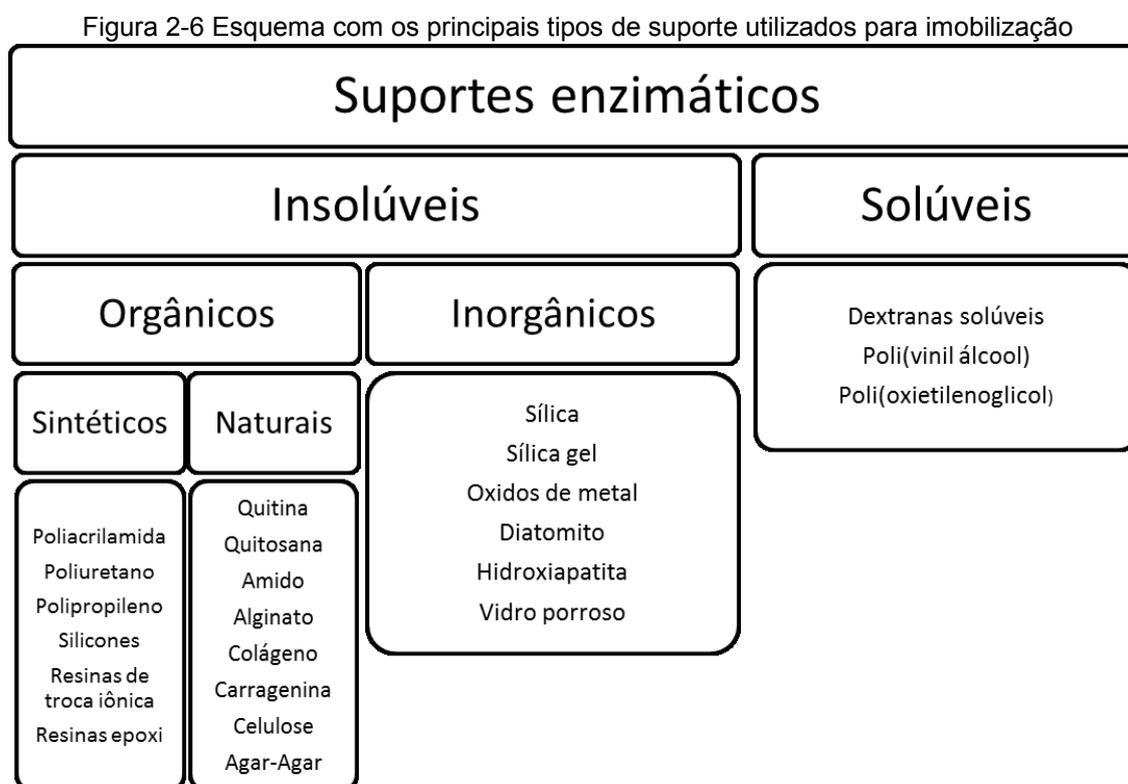
As forças de interações hidrofóbica ocorrem em termos de forças de Van der Waals e assim não são decorrente de nenhuma atração permanente (intrínseca) entre as partes apolares. O processo decorre da maior estabilidade resultante de moléculas ou regiões de macromoléculas apolares atingem pela minimização do número de moléculas de água requeridas para solvatar as porções hidrofóbicas em solução aquosa.

A força de adsorção é determinada pelas características do suporte (tais como, hidrofobicidade da superfície de suporte) e também pelas características da lipase, tais como: tamanho da tampa, número de resíduos hidrofóbicos e localização destes resíduos (Fernández-Lorente *et al.*, 2005).

### 2.5.3 Adsorventes

As propriedades ideais de materiais sólidos empregados em operações de adsorção incluem resistência física à compressão, facilidade de derivatização, biocompatibilidade e disponibilidade a baixo custo. Os suportes podem ser classificados como orgânicos, inorgânicos ou biopolímeros de acordo com a sua composição química e origem (Sheldon e Pelt, van, 2013).

A Figura 2.6 apresenta um esquema com os principais tipos de suporte utilizados para adsorção.



Fonte: Adaptado de Jesionowski *et al.*, [2014].

### 2.5.4 Adsorção hidrofóbica de lipases

Em 1998, Bastida e colaboradores reportaram a capacidade que lipases possuem de adsorverem através das áreas dos grandes centros ativos hidrofóbicos de sua estrutura. Trata-se de um mecanismo de ação peculiar, em que o sítio ativo isolado do meio por uma cadeia polipeptídica chamada tampa

(*lid*), cuja face interna possui predominância de cadeias laterais de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos desloca-se para a forma aberta na presença de uma superfície hidrofóbica.

Esse mecanismo, chamado de ativação interfacial, resultante de interação hidrofóbica, permitiu desenvolver estratégias eficientes para a purificação e imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos.

No que tange a imobilização, derivados obtidos através da adsorção hidrofóbica de lipases devem possuir estabilidade e baixa elutriação, permitindo aplicações em biocatálise e abrindo a possibilidade para hiperativação do catalisador por exposição do sítio ativo na forma aberta. As formas abertas de lipase são fortemente adsorvidas em gotas de substratos apolares (por exemplo, óleo ou gorduras) (Sabuquillo *et al.*, 1998), de modo que o centro ativo se torna acessível aos substratos e a enzima pode atuar na interface. (Bastida *et al.*, 1998).

No que tange à purificação, a grande região hidrofóbica em torno do sítio catalítico na estrutura aberta das lipases é fortemente adsorvida em Octil-agarose, onde a maioria das biomoléculas não adsorve com tanta facilidade, permitindo adsorção seletiva (Bastida *et al.*, 1998; Palomo *et al.*, 2002; Palomo *et al.*, 2005). Neste caso, baixa força iônica (muitas vezes em torno de 5 a 25 mM de tampão no pH de interesse) pode ser utilizada, favorecendo ainda mais a seletividade, já que os rendimentos de adsorção costumam ser elevados para a molécula de interesse, mesmo nessas condições.

#### 2.5.5 Suportes hidrofóbicos: sílica, agarose e efeitos de superfície

A hidrofobicidade dos adsorventes é determinada por essencialmente três variáveis que influenciam de forma direta na interação enzima suporte: tipo de grupo funcional de ativação (nessa dissertação, C1 ou C8), número de grupos funcionais na superfície (densidade de grupo) e química superficial resultante do processo de síntese e ativação do suporte, que pode ser influenciada por características da superfície sólida original.

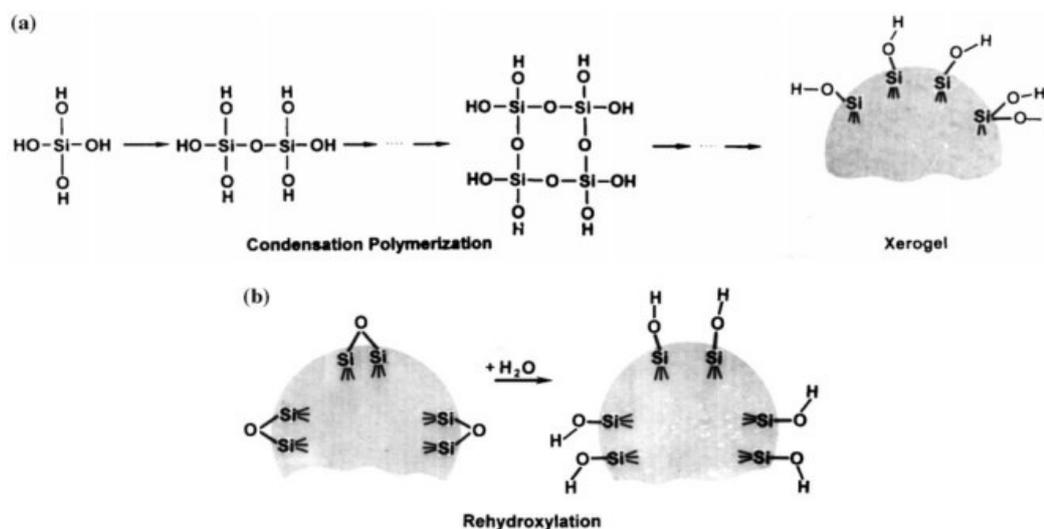
Assim, em termos de química de superfície, é importante citar diferenças em relação à superfície de sílica e agarose.

### Sílica e grupos silanóis

Sabe-se que a sílica possui grupos -OH ligados covalentemente em sua superfície. Tais grupos, denominados silanóis (Si-OH), agem como centros de adsorção física ou química, por exemplo, formando ligações Si-O-X. Neste caso, X pode ser um elemento metálico ou um grupo orgânico formado por reação com organosilanos (nesta dissertação, metil e Octil) (Amgarten, 2006).

A formação de grupos silanóis ligados à superfície da sílica depende da síntese do próprio material e pode ser ilustrada esquematicamente e de forma simplificada pela Figura-2.7.

Figura 2-7 A formação de grupos silanol na superfície da sílica: (a) polimerização de condensação; (b) Reidroxilação.



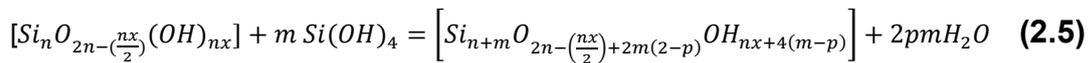
Fonte:(Zhuravlev, 2000)

Durante a síntese de silicatos, para que ocorra a reação de polimerização, é possível partir de soluções supersaturadas do monômero  $Si(OH)_4$ . Assim, é possível obter a síntese controlada ao dissolver sílica em água à alta temperatura e pressão e então resfriá-la, ou pela dissolução de silicato de sódio em água seguida de acidificação, por meio da reação (ILER, 1979):



Soluções aquosas saturadas de ácido silícico são instáveis com a diminuição do pH porque ocorre a polimerização por condensação através da

desidratação ocorre (conforme ilustrado Figura-2.7). Todos os polímeros superiores de qualquer tamanho, peso molecular ou estado de hidratação podem ser representados por uma fórmula geral contendo  $n$  átomos de silício. A polimerização de moléculas monoméricas adicionais ou a deposição de sílica pode ser representada da seguinte forma:



Em que:

$n$  = Número de átomos de silício em uma molécula de ácido polisilícico ou partícula ou rede polimérica.

$x$  = Número de grupos OH por átomo de silício no polímero, no máximo 4.

$m$  = Número de moléculas monoméricas de ácido de silícico adicionado ao polímero.

$p$  = Fração de grupos hidroxila por molécula monomérica de ácido silícico que são convertidas em água durante a reação de polimerização.

Vale destacar que devido à acidez dos grupos silanóis, a superfície da sílica amorfa é negativa, principalmente em pH neutro ao básico. É possível que a presença de grupos hidrofílicos e carga na superfície desfavoreça a adsorção hidrofóbica. Reforçando a ideia, (KISELEV, 1957 apud Zhuravlev, 2000) afirmaram que a remoção dos grupos hidroxila da superfície da sílica faz com que a superfície adquira cada vez mais propriedades hidrofóbicas.

A ativação da sílica com grupos orgânicos certamente tem o potencial de reduzir a presença dos grupos silanóis, onde são ligados às cadeias carbônicas, por exemplo. Porém, não há garantias de que todos os grupos silanóis sofram de fato ligações. Assim, podem permanecer cargas negativas na superfície mesmo após ativação. Vale destacar que a utilização de silicato de sódio como precursor de sílica, resulta na presença de sal de sódio (NaCl) no meio reacional, conforme aponta a reação (2.4). Segundo (ILER, 1979), mesmo em baixas concentrações, há uma tendência de o sal permanecer associado à superfície carregada das partículas coloidais.

A presença de cargas na superfície da sílica pode desfavorecer a interação

hidrofóbica. Porém, sua existência pode favorecer a adsorção iônica de proteínas, dependendo da carga dos resíduos e assim do pH da adsorção. A partir dessa suposição, Lopes (2016) levantou a hipótese de que ocorresse adsorção através de dois mecanismos: o hidrofóbico e o iônico, de modo a justificar a aparente dificuldade de dessorção da BTL-2 em sílica funcionalizada com Octil, considerando que a adsorção iônica seria um mecanismo que poderia aumentar a interação enzima-superfície.

#### Agarose e Octil-agarose

O gel de agarose é um polissacarídeo constituído de repetições de unidades de agarobiose, o qual é constituído de unidades alternadas de galactose e 3,6-anidrogactose. A agarose é um componente do ágar que é uma mistura de polissacarídeos isolados de algas utilizada normalmente em concentrações de 1 a 3 %. A propriedade gelificante é atribuída à formação de pontes de hidrogênio inter e intra-moleculares entre as cadeias de agarose. O tamanho do poro do gel é controlado pela concentração da agarose (quanto mais alta a concentração, menor o tamanho dos poros). Géis de agarose são utilizadas para separações de proteínas e ácidos nucleicos. Para proteínas, os poros formados com gel a 1 % são grandes em relação ao tamanho das proteínas (Wilson e Walker, 2010).

Em contraponto à sílica, a agarose possui grande neutralidade e resulta em uma superfície extremamente inerte e pouco ionizável. Após a ativação, a Octil-Sepharose 4B comercial torna-se um suporte altamente ativado contendo 40  $\mu\text{mol}$  de grupos Octil por mL de suporte. Esse suporte é capaz de carregar até 20–30 mg / mL de uma proteína de tamanho médio (por exemplo, massa molecular de 60.000 daltons), ou seja, uma concentração de proteína de 0,5  $\mu\text{mol}$  / mL. Pode-se então supor que cada molécula de enzima pode interagir com uma superfície plana contendo 60-80 resíduos de Octil, isto é, uma interface altamente hidrofóbica (Bastida *et al.*, 1998).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Enzima BTL-2

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

##### 3.1.2 Enzima Lisozima

A lisozima de clara de ovo de galinha de alta pureza foi adquirida da Sigma Aldrich (62971).

##### 3.1.3 Suportes

Os suportes de sílica, PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C-8, PURIFICA-X-C-16 e PURIFICA-Y-DIOL com superfície modificada pela adição de grupos metil, Octil, hexadecil e DIOL respectivamente, foram doados pela empresa Kopp Technologies. Octil-Sepharose® CL-4B (agarose- Octil) foi adquirida da GE Healthcare (Uppsala, Suécia) (tamanho médio da partícula 90  $\mu$ m). A Tabela-3.1 sumariza os dados de cada suporte de sílica, conforme especificação Kopp Technologies.

Tabela 3-1 Caracterização suportes de sílica Kopp Technologies

	<b>Purifica-Y-DIOL</b>	<b>Purifica-Y-C1</b>	<b>Purifica-Y-C8</b>	<b>Purifica-X-C16</b>
<b>Tamanho de partícula (µm)</b>	53-75	53-75	53-75	53-75
<b>Diâmetro de poro (nm)</b>	12	12	12	6-8
<b>Classe de grupos funcionais</b>	Hidrofóbico	Hidrofóbico	Hidrofóbico	Hidrofóbico
<b>Concentração de grupos funcionais (µmol/g)</b>	564	727	142	329

Fonte: Portfólio Kopp Technologies.

### 3.1.4 Reagentes, sais, solventes.

Kit de determinação de proteína por ácido bicinconínico, reagente de Bradford, padrão de proteína BSA, e tributirina foram adquiridos da Sigma- Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Triton X-100 foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, RJ). Fosfato de sódio bibásico, fosfato de sódio da Synth (São Paulo, Brasil).

## 3.2 Métodos analíticos

### 3.2.1 Medida de atividade: Hidrólise da Tributirina

A atividade enzimática de BTL-2 livre e adsorvida em diferentes suportes foi determinada pelo método de hidrólise da tributirina, conforme metodologia adaptada de Beisson et al. (2000). O método baseia-se na velocidade inicial de hidrólise de tributirina (1 mL de tributirina, 5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5 e 14 mL de água destilada), a 37°C. O ácido butírico liberado em 5 minutos era titulado com solução de KOH 0,020M padronizada, com o pH mantido em 7,5 pelo pHstato. Foi utilizado o equipamento pHstato modelo 907 Titrande (Metrohm AG, Switzerland). A concentração de enzima utilizada no ensaio foi controlada para garantir que a formação de ácido não passasse de 10% da máxima possível, garantindo-se que velocidade inicial fosse medida. Uma unidade de atividade (TBU) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de ácido butírico por minuto sob as condições reacionais (Equação 3.1):

$$\text{Atividade } \left( \frac{U_{TBU}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{mL de titulante por minuto} * \text{concentração molar do titulante} * 1000}{\text{mL da amostra}} \quad (3.1)$$

### 3.2.2 Determinação de proteínas totais

Foi utilizado o método do ácido bicinonínico (BCA) segundo Smith (1985). Utilizou-se kit de medida de proteína comercial da Sigma-Aldrich contendo uma solução de ácido bicinonínico (reagente A) e uma solução 4% (m/v) de sulfato de cobre (II) pentahidratado (reagente B). O reagente A foi misturado ao reagente B na proporção 50:1. Então, 0,05mL de amostra foi adicionado a 1 mL da mistura e incubado a 37 °C por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro, a 562 nm, e uma curva de concentrações de albumina de soro bovino (BSA) era utilizada como padrão.

### 3.3 Procedimentos experimentais

#### 3.3.1 Obtenção do extrato enzimático de BTL-2

Utilizando as condições otimizadas obtidas por Lopes, 2016, uma determinada quantidade da biomassa previamente produzida, estocada em ultrafreezer, foi ressuspensa em tampão fosfato pH 8,0 (100 mM) na concentração de 20 g/l. As células em suspensão foram submetidas à sonicação com 10 pulsos de 1 minuto (8-10 watts) e amplitude de 20 mHz com intervalo de 30 segundos entre cada pulso utilizando o sonicador da marca VIBRA-CELL modelo VCX. Em seguida, a suspensão resultante foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos, a 4°C, e o sobrenadante armazenado à -16°C para posterior utilização nos ensaios de adsorção.

#### 3.3.2 Estudo da influência da etapa de hidratação dos suportes hidrofóbicos

Os materiais baseados em sílica costumam ser armazenados secos, como ocorre com os materiais comerciais PURIFICA-Y-C1 e PURIFICA-Y-C8 (KOPP). Assim, eles precisam ser hidratados antes da aplicação. Para hidratação dos suportes PURIFICA-Y-C1 e C8 foram testados dois protocolos, cuja eficácia foi avaliada através do rendimento de adsorção (%) obtidos pelos dois métodos.

- *Protocolo de hidratação 1*

Esse procedimento de hidratação adotado inicialmente, consiste na lavagem do suporte com 5 vezes o volume do reator (cerca de 6 mL). Ou seja, o suporte era lavado por 30 ml de tampão 5 mM, conforme metodologia descrita por (Guisán, 2006).

- *Protocolo de hidratação 2*

Posteriormente, foram realizados ensaios em que os suportes de sílica PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e PURIFICA-X-C16 eram colocados em tampão fosfato 5mM sob agitação de 50 rpm (roller) na proporção de 1:10 durante 24h.

### 3.3.3 Adsorção de BTL-2 e Lisozima em suportes hidrofóbicos com diferentes grupos funcionais.

O procedimento experimental para avaliar quantitativamente a adsorção consiste em colocar em contato a solução contendo o componente a ser adsorvido em diferentes concentrações com massa fixa de adsorvente até atingir o equilíbrio, mantendo-se o pH e a temperatura constantes. Os ensaios foram realizados a 25 °C, pH 7 e sob agitação de 50 rpm em roller.

A quantidade de adsorbato por unidade de massa de adsorvente, também denominada de carga protéica ( $q_t$ ) oferecida na adsorção obtida em reatores do tipo batelada é calculada através da equação 3.2:

$$q_t = \frac{C_0}{m} \times V \quad (3.2)$$

Em que:

$C_0$  = Concentração inicial de proteínas na solução inicial (mg/ml)

$V$  =Volume da batelada (ml);

$m$  =massa do material adsorvente (g)

A concentração de proteínas em solução na solução inicial  $C_0$ , é obtida por

meio de leituras em espectrofotômetro pelo método de determinação de proteínas BCA.

A proteína total teoricamente adsorvida ( $q_0$ ) obtida em reatores do tipo batelada é calculada através da equação 3.3:

$$q_0 = \frac{Pt_0 - Pt_f}{m} \times V \quad (3.3)$$

Em que:

$Pt_0$  = medida de proteínas totais na amostra de controle ao final da adsorção (mg/ml)

$Pt_f$  = medida de proteínas totais na amostra de sobrenadante ao final da adsorção (mg/ml)

$V$  = Volume da batelada etapa de adsorção (ml)

$m$  = massa do material adsorvente etapa de adsorção (g).

### 3.3.4 Cálculo de rendimento de adsorção

O rendimento de adsorção de proteínas totais era calculado conforme a Equação 3.4.

$$RA_P(\%) = \frac{Pt_0 - Pt_f}{Pt_0} \times 100 \quad (3.4)$$

O rendimento de adsorção de enzima era calculado conforme a equação 3.5.

$$RA_E(\%) = \frac{At_0 - At_f}{At_0} \times 100 \quad (3.5)$$

Em que:

$At_0$  = Atividade medida na amostra de controle ao final da adsorção (mg/ml).

$At_f$  = Atividade medida na amostra de sobrenadante ao final da adsorção (mg/ml).

Para a lisozima o rendimento de adsorção de proteínas totais é idêntico ao rendimento de adsorção da enzima, devido à alta pureza dessa enzima.

### 3.3.5 Cinética de adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos

O extrato enzimático de BTL-2 obtido anteriormente conforme descrito no item 3.3.1 foi adicionado em tampão fosfato de sódio pH 7,0 e 5 mM na proporção de 3:1 resultando em uma solução com atividade enzimática final de aproximadamente 44 UI/ml. Adicionou-se a solução aos diferentes suportes, previamente umidificados com o mesmo tampão da adsorção, na proporção de 1:10 m/v. A suspensão foi mantida sob agitação em roller a 50 rpm e 25°C. Foram coletadas alíquotas do sobrenadante em intervalos pré-determinados, medindo-se atividade lipolítica pelo método da hidrólise da tributirina e proteínas totais pelo método BCA descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2 respectivamente, até obter uma concentração de proteínas aproximadamente constante no sobrenadante. Para ajuste dos dados experimentais foi utilizado o software Origin 8.

### 3.3.6 Cinética de adsorção de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos

Uma solução de lisozima 15 mg/ml previamente preparada em água destilada foi adicionada em tampão fosfato de sódio pH 7,0 e 50 mM na proporção de 1:1 resultando em uma solução com concentração proteica final de aproximadamente 7,5 mg/ml, pH 7,0 e 25 mM. Adicionou-se a solução aos diferentes suportes, previamente umidificados com o mesmo tampão, na proporção de 1:10 m/v. A suspensão foi mantida sob agitação em roller a 50 rpm e 25 °C. Foram coletadas alíquotas do sobrenadante em intervalos pré-determinados, medindo-se proteínas totais pelo método BCA até obter uma concentração de proteínas aproximadamente constante no sobrenadante. Para ajuste dos dados experimentais foi utilizado o software Origin 8.

### 3.3.7 Cinética de dessorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos

Foi avaliada a influência do tempo na dessorção da lipase de BTL-2 nestes suportes a fim de determinar o tempo necessário para realização do procedimento de dessorção. Era preparada uma solução de Triton-X-100 na concentração de 1% (m/v) preparada em tampão fosfato pH 7 (5 mM). A solução era adicionada aos derivados (suporte+enzima) na proporção 1:10 (m/v) e a suspensão deixada sob agitação em roller a 50 rpm, 25 °C. Eram coletadas alíquotas do sobrenadante em intervalos pré-determinados, medindo atividade enzimática pelo método da hidrólise da tributirina e proteínas totais pelo método BCA descrito no item 3.2.2 até obter-se concentração de proteínas (mg/ml) constante no sobrenadante de dessorção.

### 3.3.8 Cinética de dessorção de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos

Foi avaliada a influência do tempo na dessorção da Lisozima a fim de determinar o tempo necessário para realização do procedimento de dessorção. Era preparada uma solução de Triton-X-100 na concentração de 1% (m/v) preparada em tampão fosfato pH 7 (25 mM). A solução era adicionada aos derivados (suporte+enzima) na proporção 1:200 (m/v) e a suspensão deixada sob agitação em roller a 50 rpm, 25°C. Eram coletadas alíquotas do sobrenadante em intervalos pré-determinados, medindo proteínas totais pelo método BCA até obter-se concentração de proteínas (mg/ml) constante no sobrenadante de dessorção.

### 3.3.9 Dessorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos

Para dessorção da enzima BTL-2 dos suportes, era utilizada solução de Triton-X-100 na concentração de 1% (m/v) preparada em tampão fosfato pH 7 (5 mM). A solução era adicionada aos derivados (suporte+enzima) em diferentes proporções m/v e a suspensão deixada sob agitação em roller a 50 rpm, 25°C e 16h, de modo a garantir o equilíbrio da concentração de proteínas entre o sólido (mg/g) e o sobrenadante (mg/ml). A medida de atividade (UI/ml) era realizada em

1,5h. Ao final desse período, o derivado era submetido à filtração a vácuo (-400 mmHg, 1 min), realizando-se então a determinação de proteínas totais (BCA) no sobrenadante final da solução de dessorção para cálculo do rendimento de dessorção.

### 3.3.10 Cálculo de rendimento de dessorção

O parâmetro *rendimento* costuma ser utilizado para comparação da eficácia de um adsorvente para dessorção ou imobilização de enzimas em batelada. Para o caso da dessorção ( $R_{DP}$ ), o parâmetro em termos de proteína é obtido por meio da equação 3.6 (Lopes, 2016).

$$R_{DP} = \frac{C_e \times V}{q_o \times m} \quad (3.6)$$

Em que:

$C_e$  = Concentração de proteínas no sobrenadante (mg/ml)

$q_o$  = Concentração de proteínas teoricamente adsorvidas no suporte (mg/g)

$V$  = Volume de batelada processo de dessorção (ml)

$m$  = Massa de derivado processo de dessorção (g)

### 3.3.11 Obtenção das isotermas de dessorção

Analisando-se a equação 3.6, nota-se que o rendimento de dessorção comumente encontrado na literatura é diretamente proporcional ao volume de batelada ( $V$ ) utilizado na etapa de dessorção. Para fins de simplificação, neste trabalho, a razão  $\frac{V}{m}$  empregada no processo de dessorção (denominada na dissertação de *razão de lavagem*) será denominada  $\beta$ .

Para construção das isotermas, após atingido o equilíbrio, dados de  $C_e$  foram obtidos por meio de leitura em espectrofotômetro conforme item 3.2.2, conhecidos  $\beta$  e  $q_o$ , possibilitando o cálculo de  $q_e$  através da equação 4.6, conforme detalhado na seção 4.3.

Os dados de  $C_e$  em função de  $q_e$ , para diferentes valores de  $\beta$  resultam na

obtenção das isotermas de dessorção para um dado suporte. Demais condições como agitação, pH e temperatura foram mantidas constantes em 50 rpm, pH 7,0 e 25°C, respectivamente.

### 3.3.12 Adsorção de lisozima em sílica pura pH 3 e 7

Uma solução de lisozima 15 mg/ml previamente preparada em água destilada foi adicionada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 3 e 7, respectivamente na proporção de 1:1 resultando em uma solução com concentração proteica final de aproximadamente 7,5 mg/ml e 25 mM. Adicionou-se a solução a pH 3 e 7 em sílica pura, ou seja, sem funcionalização, previamente umidificados com o mesmo tampão, na proporção de 1:10 m/v resultando em carga proteica de 10 mg/g. A suspensão foi mantida sob agitação em roller a 50 rpm e 25°C. Foram coletadas alíquotas do sobrenadante em intervalos pré-determinados, medindo-se proteínas totais pelo método BCA até obter uma concentração de proteínas aproximadamente constante no sobrenadante, conforme item 3.2.2. Para ajuste dos dados experimentais foi utilizado o software Origin 8.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Influência do protocolo de hidratação no desempenho dos suportes hidrofóbicos

Ensaio preliminares permitiram verificar a influência do protocolo de hidratação, etapa que antecede a adsorção, no desempenho dos suportes PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e PURIFICA-X-C16 na adsorção de BTL-2. Foram obtidos diferentes resultados de rendimento de adsorção para os suportes PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e PURIFICA-X-C16 utilizando os protocolos de hidratação 1 e 2, conforme Tabela 4.1:

Tabela 4-1 Rendimentos de adsorção obtidos pelos dois protocolos diferentes de hidratação do suporte. Proporção 1:24 (m/v). Carga proteica (15 mg/g); Volume de solução=6 mL; massa de suporte=0,25g, C<sub>prot</sub>=0,625 mg/ml; 25°C, durante 16h; 50 rpm.

Suporte	Protocolo de hidratação 1 (Lavagem com 5x volume)		Protocolo de hidratação 2 (Incubação em tampão)	
	RAE (%)	RAP (%)	RAE (%)	RAP (%)
PURIFICA-Y-C1	87,64±1,09	63,48±1,18	100%	85,25±1,54
PURIFICA-Y-C8	75,31±0,58	41,25±0,34	100%	88,82±4,30
PURIFICA-X-C16	19,39±0,06	22,32±0,38	91,33±2,37	68,36±1,41

Fonte: Próprio autor (2019)

**RAE:** Rendimento de adsorção de enzima. **RAP:** Rendimento de adsorção de proteínas.

Pode-se observar uma melhora dos resultados de rendimento de adsorção para os 3 suportes ao utilizar-se o protocolo 2 de adsorção, indicando que a etapa de hidratação influencia de forma significativa no processo de adsorção da BTL-2. Essa diferença se deve possivelmente à disponibilidade completa dos poros para adsorção após a umidificação prolongada, o que indica que com menos tempo de umidificação, poros internos poderiam ainda conter ar, impedindo o acesso das macromoléculas à toda a superfície interna das partículas. Naturalmente, o tamanho da molécula a ser adsorvida influencia no processo de umidificação durante a adsorção, pois macromoléculas menores podem permitir a umidificação mesmo durante a adsorção, reduzindo ou mesmo eliminando os

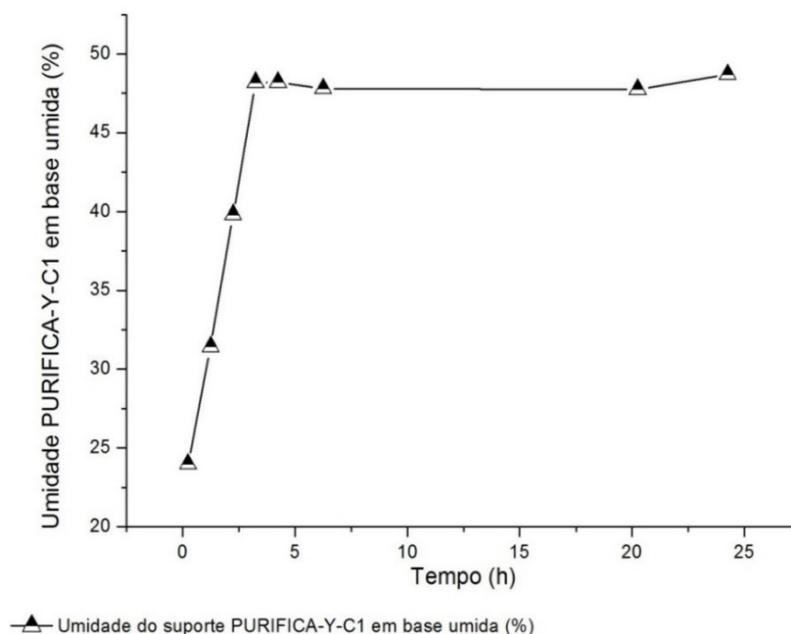
efeitos da etapa inicial de hidratação, enquanto proteínas maiores (ou de tamanho mediano) podem dificultar o acesso da água e mesmo de macromoléculas às partes mais internas da estrutura porosa. Dada a observação, recomenda-se um ensaio de umidificação com os materiais porosos antes da realização dos ensaios de adsorção, de modo a garantir a hidratação completa dos poros ou ao menos a reprodutibilidade do processo, identificando o tempo de umidificação necessário para que a umidade do material permaneça estável. Este procedimento é ainda mais crítico no caso de materiais de superfície hidrofóbica, como utilizados aqui.

Deste modo, com o objetivo de avaliar o perfil de molhabilidade dos suportes hidrofóbicos, cinéticas de umidificação foram levantadas para os diferentes suportes de sílica funcionalizada.

#### 4.1.1 Umidade em base úmida (%) em função do tempo para os diferentes suportes hidrofóbicos.

A umidade em base úmida (%) em função do tempo para o suporte PURIFICA-Y-C1, durante incubação em tampão fosfato 5 mM é apresentada conformes figuras 4.1, 4.2 e 4.3.

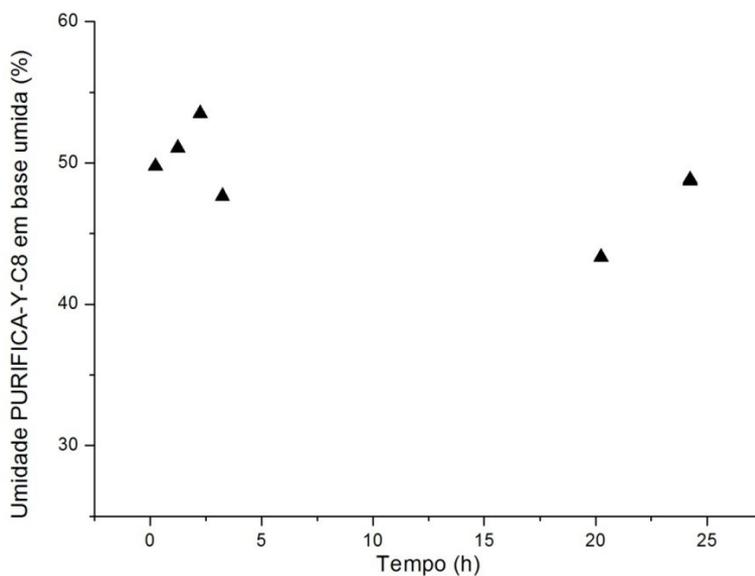
Figura 4-1 Umidade em base úmida (%) em função do tempo do suporte PURIFICA-Y-C1, durante incubação em tampão fosfato 5 mM.  
Umidade do suporte PURIFICA-Y-C1 em base úmida (%) em função do tempo



Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 4-2 Umidade em base úmida (%) em função do tempo do suporte PURIFICA-Y-C8, durante incubação em tampão fosfato 5 mM.

Umidade do suporte PURIFICA-Y-C8 em base úmida (%) em função do tempo

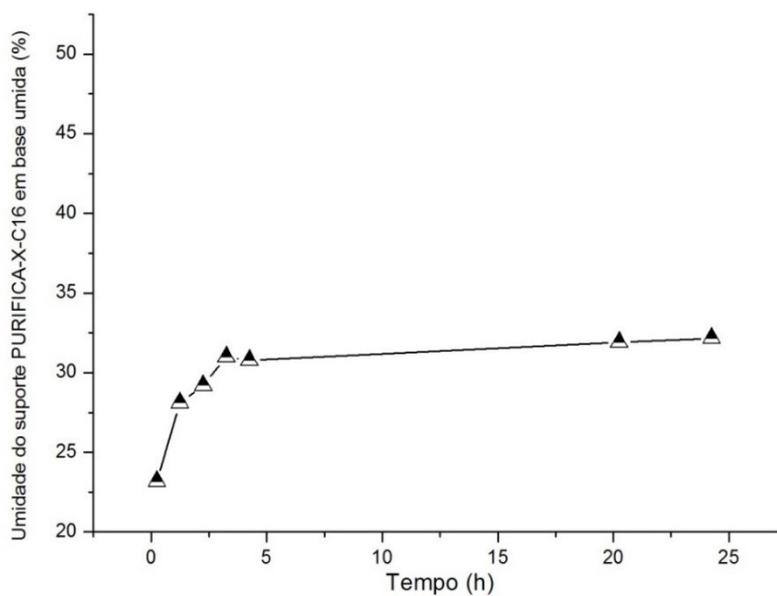


▲ Umidade do suporte PURIFICA-Y-C8 em base úmida (%)

Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 4-3 Umidade em base úmida (%) em função do tempo do suporte PURIFICA-X-C16, durante incubação em tampão fosfato 5 mM.

Umidade do suporte PURIFICA-X-C16 em base úmida (%) em função do tempo



▲ Umidade do suporte PURIFICA-X-C16 em base úmida (%)

Fonte: Próprio autor (2019)

Com excessão dos dados obtidos para o suporte PURIFICA-Y-C8, onde não se obteve um perfil claro de molhabilidade, as umidades obtidas em função do tempo confirmaram a influência do tempo na hidratação do suporte. Os pontos experimentais obtidos para PURIFICA-Y-C8 podem ser justificados devido à visível dificuldade de homogeneização desse suporte em tampão fosfato. Assim, fixou-se 16 horas de incubação para esse suporte, pois sob esse tempo de incubação, observa-se sua homogeneização em solução.

Com base nesses ensaios, constatou-se ainda que 4 horas para hidratação do suporte PURIFICA-Y-C1 e PURIFICA-X-C16 são suficientes para garantir estabilidade na umidade desses suportes. Ao utilizar esse procedimento nos ensaios de adsorção para os grupos de trabalho escolhidos (C1 e C8), verificou-se que a umidade era de fato reprodutível, já que em todos os ensaios de imobilização uma alíquota era retirada para determinação de umidade após filtração à vacuo.

Além disso, pôde-se observar que mesmo utilizando-se o protocolo 2, em que os rendimentos de adsorção obtidos foram melhores, não se obteve 100% de rendimento de adsorção de BTL-2 no suporte PURIFICA-X-C16 para mesma carga protéica e condições operacionais utilizadas para o PURIFICA-Y-C1 e PURIFICA-Y-C8. Isto pode ter sua explicação na própria curva de umidificação. A umidade final dos suportes PURIFICA-Y-C1 e PURIFICA-Y-C8 em base úmida é em torno de 50% enquanto do suporte-PURIFICA-X -C16 32%, o que pode ser explicado pelo diâmetro de poro desses suportes que são respectivamente, 13,76; 13,10 e 7,91 nm.

Possivelmente ainda há poros sem hidratação no suporte ativado com 16 carbonos. Assim, há dificuldade de acesso da enzima aos poros no PURIFICA-X-C16, visto que trata-se de um adsorvente mais hidrofóbico (maior cadeia carbônica) e que apresentou menor umidade (%) final.

Para melhorar a hidratação do suporte PURIFICA-X-C16 pode-se utilizar um solvente orgânico e relativamente apolar em água na hidratação, como o etanol-água, seguida de lavagens sucessivas com água pura. Porém, optou-se por prosseguir os ensaios de adsorção com os suportes de sílica PURIFICA-Y-C1 e PURIFICA-Y-C8. Em paralelo aos ensaios de adsorção subsequentes realizados com os suportes de sílica funcionalizada com carbono foram também realizados ensaios com o suporte Octil-agarose sob as mesmas condições, para fins de

comparação. A Octil-agarose não possui problemas de hidratação, pois não é comercializada seca. Porém, sucessivas lavagens são necessárias para equilibrar o sólido com o meio de adsorção.

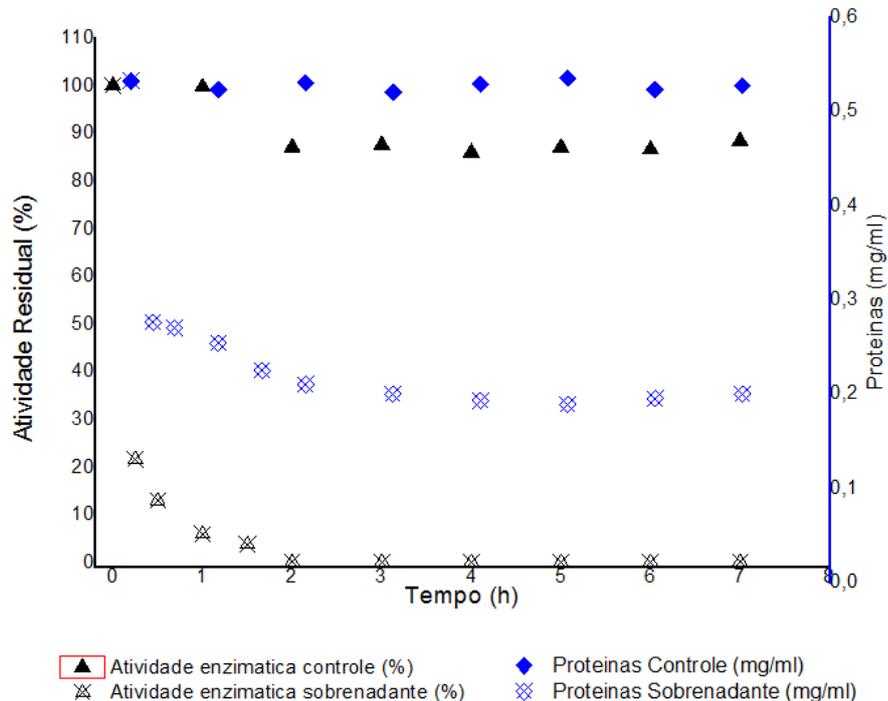
## 4.2 Adsorção

### 4.2.1 Cinéticas de adsorção de BTL-2 em PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose.

Foi avaliada a influência do tempo de adsorção da lipase de BTL-2 a fim de determinar o tempo necessário para realização do procedimento de adsorção até o equilíbrio.

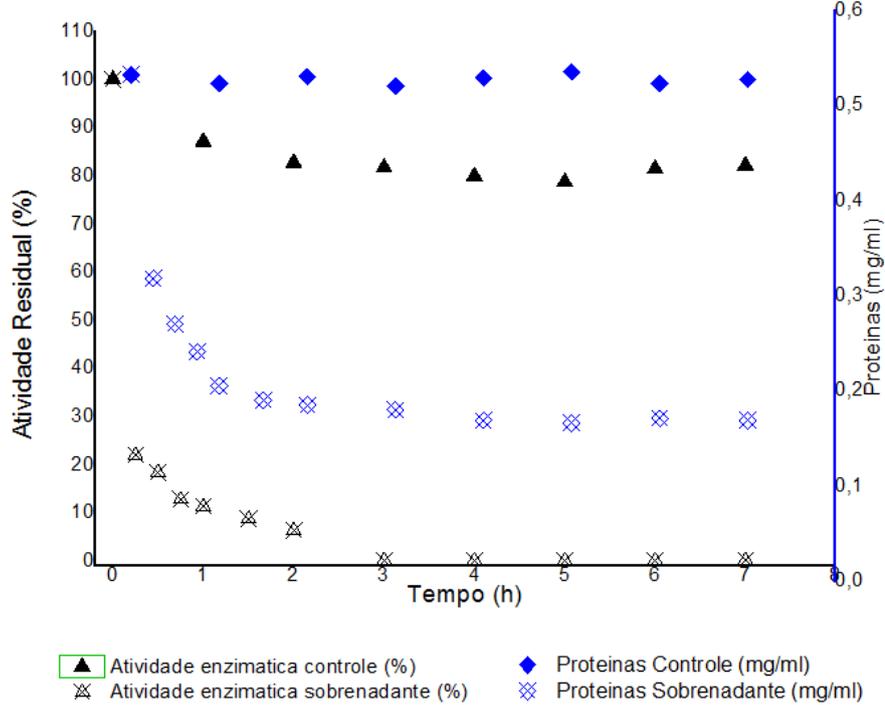
As Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 apresentam os resultados de cinética de adsorção de BTL-2 em cada um dos adsorventes utilizados.

Figura 4-4 Cinética de Adsorção de BTL-2 em Suporte PURIFICA-Y-C1



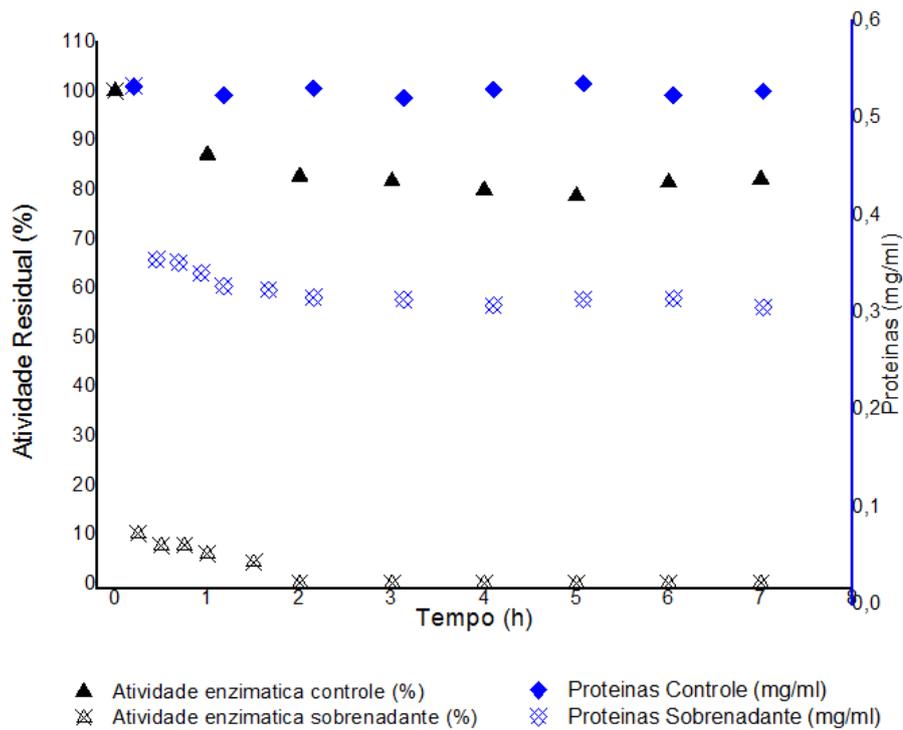
Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 4-5 Cinética de adsorção de BTL-2 em Suporte PURIFICA-Y-C8



Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 4-6 Cinética de Adsorção de BTL-2 em Octil-Agarose



Fonte: Próprio autor (2019)

As cinéticas mostraram que o equilíbrio de adsorção foi atingido em cerca de 2 horas em todos os materiais, considerando que o teor de proteínas no

sobrenadante tornou-se constante e a atividade enzimática medida no sobrenadante tendeu a zero, indicando rendimento de adsorção de 100% da enzima para a carga enzimática de 5mg/g. A diferença de perfil de adsorção entre a molécula alvo *BTL-2* e as proteínas totais, principalmente para o suporte Octil-agarose é indicador de seletividade.

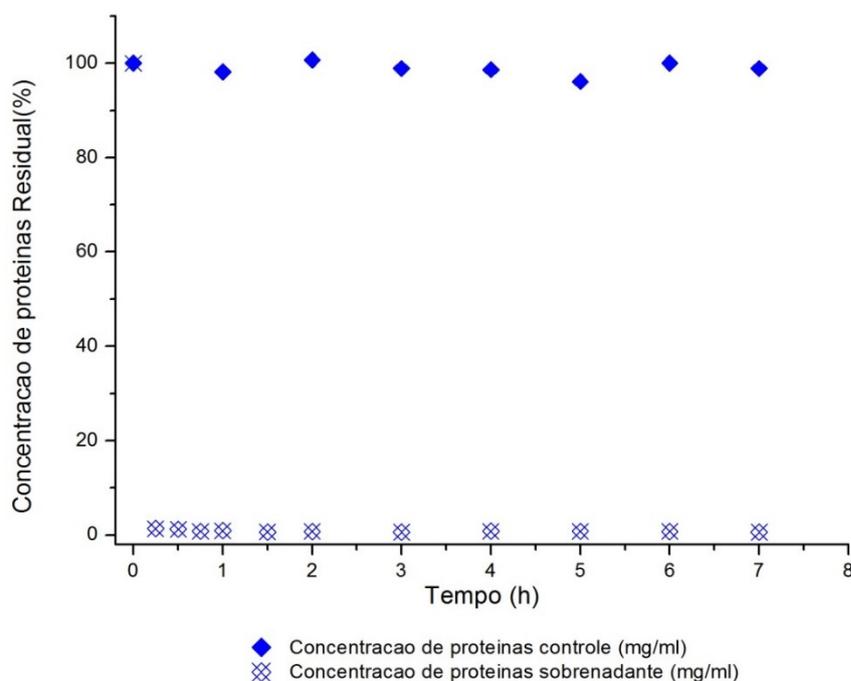
Mendes, 2009 reportou 100% de imobilização de BTL-2 em Octil-agarose em 30 min para um carga proteica de 1mg/g sob as mesmas condições, tampão fosfato pH 7, 5 mM a 25°C.

#### 4.2.2 Cinéticas de adsorção de Lisozima em PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose.

Foi avaliada a influência do tempo de adsorção da Lisozima nestes suportes a fim de determinar o tempo necessário para realização do procedimento de adsorção até o equilíbrio.

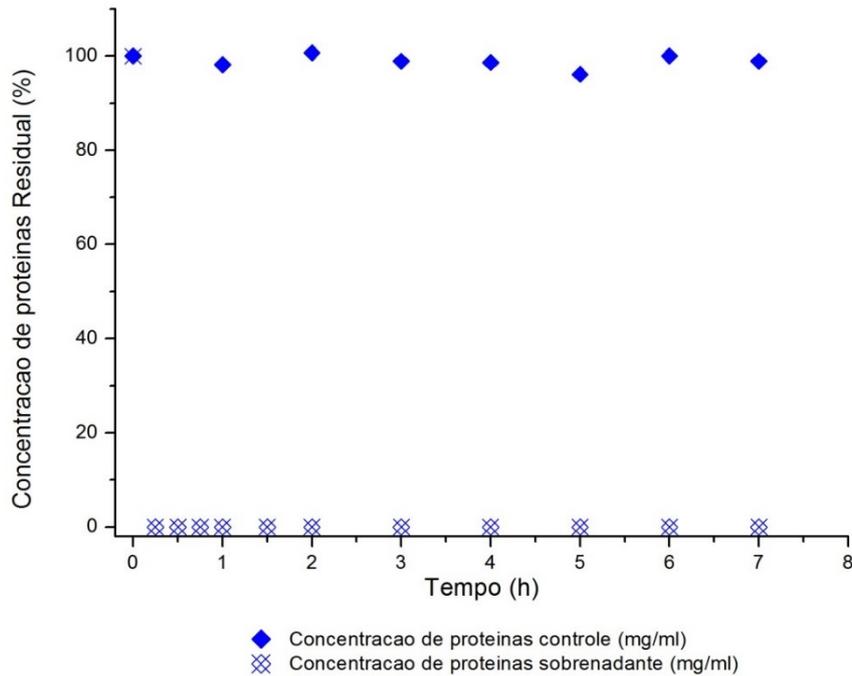
As Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 apresentam os resultados de cinética de adsorção de Lisozima em cada um dos adsorventes utilizados.

Figura 4-7 Cinética de Adsorção de Lisozima em Suporte PURIFICA-Y-C1



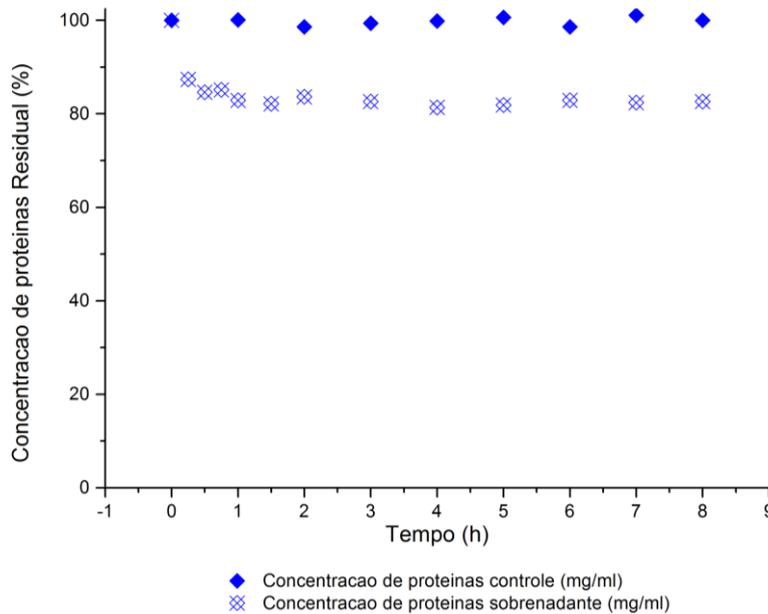
Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 4-8 Cinética de Adsorção de Lisozima em Suporte PURIFICA-Y-C8



Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 4-9 Cinética de Adsorção de Lisozima em Suporte Octil-agarose



Fonte: Próprio autor (2019)

As cinéticas mostraram que o equilíbrio de adsorção foi atingido em menos de 1 hora em todos os materiais, considerando que o teor de proteínas no sobrenadante tornou-se constante. Além disso, os suportes de sílica apresentaram maior capacidade de adsorção que o suporte Octil-agarose.

Considerando-se que a cinética é influenciada pela carga proteica (mg/g) e que os ensaios de adsorção de BTL-2 e lisozima que foram realizados com diferentes cargas proteicas, optou-se por deixá-los 16h de modo a garantir que o equilíbrio de adsorção fosse atingido. As últimas 3 leituras em espectrofotômetro das alíquotas do sobrenadante de dessorção, tomadas de tempos em tempos, apresentaram valor aproximadamente constante para o teor de proteínas no sobrenadante (erro relativo < 5%).

#### 4.2.3 Adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos

Os resultados de adsorção para os três suportes foram sumarizados nas Tabela 4.2 e 4.3.

Tabela 4-2 Concentrações iniciais e finais de enzima (UTBU/mL) e de proteínas (mg/L) na adsorção de Lipase BTL-2 em suportes PURIFICA-Y-C1, C8 e Octil-agarose, e respectivas massas de suporte utilizadas ( $g_{\text{sólido}}$ ). Razão suporte/ solução = 1:10 m/v,  $C_{\text{prot}_0}$  = 0,551 mg/mL,  $C_{\text{enz}_0}$  = 65,42 UTBU/mL, T = 25°C, tampão fosfato 5mM pH7,5, durante 16 horas; Volume de solução = 8 mL.

<b>Suporte</b>	<b>Massa de suporte (<math>g_{\text{sólido}}^*</math>)</b>	<b><math>C_{\text{prot}_f}</math> (mg /ml)</b>	<b><math>C_{\text{enz}_f}</math> U<sub>TBU</sub> /mL</b>	<b>Carga proteica oferecida (mg/ <math>g_{\text{sólido}}^*</math>)</b>
<b>PURIFICA-Y-C1</b>	1,13 $g_{\text{s.s}}$	0,121	0	3,91
<b>PURIFICA-Y-C8</b>	0,77 $g_{\text{s.s}}$	0,120	0	5,74
<b>Octil-agarose</b>	1,00 $g_{\text{s.t}}$	0,224	0	4,41

Fonte: Próprio autor (2019)

$C_{\text{enz}_0}$ : Concentração enzimática solução inicial.  $C_{\text{enz}_f}$ : Concentração enzimática sobrenadante final.

$C_{\text{prot}_0}$ : Concentração de proteínas solução inicial.  $C_{\text{prot}_f}$ : Concentração de proteínas sobrenadante final.

Em que  $g_{\text{sólido}}^*$  é dado em  $g_{\text{sólido seco}}$  para os suportes de sílica e  $g_{\text{sólido total}}$  para o suporte Octil-agarose.

Tabela 4-3 Rendimentos em enzima e proteína (%) e atividades específicas iniciais e finais na adsorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos.

<b>Suporte</b>	<b>RAE (%)</b>	<b>RAP (%)</b>	<b>AECF (UTBU/mg proteína)</b>	<b>AETD (UTBU/mg proteína)</b>
<b>PURIFICA-Y-C1</b>	100,00	78,19	26,32	151,97
<b>PURIFICA-Y-C8</b>	100,00	78,01	26,32	152,32
<b>Octil-agarose</b>	100,00	59,30	26,32	200,38

Fonte: Próprio autor (2019)

RAE: rendimento da adsorção de enzima. RAP: rendimento de adsorção de proteína. AECF: atividade específica no controle ao final do processo. AETD: atividade específica teórica no derivado.

A afinidade de lipases por superfícies hidrofóbicas favorece a adsorção nesses suportes e o aumento da atividade específica no derivado indicando que houve adsorção seletiva da BTL-2 em relação às proteínas contaminantes.

Dentre os suportes testados, Octil-agarose foi o que adsorveu a lipase de forma mais seletiva, já que o rendimento para a atividade foi de 100% em todos os casos, mas a mesma apresentou menor rendimento de adsorção de proteína entre todos os materiais. Sendo que a atividade específica passou de 26,32 UTBU/mg de proteína na solução de adsorção oferecida para 200,38 UTBU/mg no derivado (atividade teórica adsorvida ao suporte). A maior seletividade pela lipase, uma proteína tão hidrofóbica, é um indicativo de que a ação da superfície do suporte Octil-agarose é mais hidrofóbica, o que é indicado também pelos ensaios de dessorção apresentados no item 4.3.3.

Os dados estão de acordo com Lopes (2016) que afirma maior seletividade do suporte Octil-agarose com relação ao suporte sílica-octil para a adsorção da enzima BTL-2, reportando dados em que a atividade específica passou de 74,85 UTBU/mg de proteína na solução de adsorção oferecida para 117,31 UTBU/mg no derivado (enzima + suporte).

#### 4.2.4 Adsorção de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos

Os dados de adsorção de lisozima para os três suportes para condição foram sumarizados na Tabela 4.4 e 4.5.

Tabela 4-4 Concentrações iniciais e finais de proteínas (mg/mL) na adsorção de Lisozima em suportes PURIFICA-Y-C1, C8 e Octil-agarose, e respectivas massas de suporte utilizadas (gsólido). Razão suporte/ solução = 1:10 m/v, T= 25°C, tampão fosfato 25 mM pH 7, durante 16 horas; Volume de solução=5mL.

<b>Suporte</b>	<b>Massa de suporte (g* sólido)</b>	<b>C<sub>prot<sub>0</sub></sub> (mg /ml)</b>	<b>C<sub>prot<sub>f</sub></sub> (mg /ml)</b>	<b>Carga proteica oferecida (mg/ g* sólido)</b>
<b>PURIFICA-Y-C1</b>	0,56 g <sub>s.s</sub>	8,65	0,03	86,5
<b>PURIFICA-Y-C8</b>	0,51 g <sub>s.s</sub>	8,65	0	97,9
<b>Octil-agarose</b>	0,5 g <sub>s.t</sub>	7,29	5,97	85

Fonte: Próprio autor (2019)

$C_{prot_0}$ : Concentração de proteínas solução inicial.  $C_{prot_f}$ : Concentração de proteínas sobrenadante final.

Tabela 4-5 . Rendimentos em proteína (%) na adsorção de lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos.

<b>Suporte</b>	<b>RAP (%)</b>	<b>PtTea (mg/ g* sólido)</b>
<b>PURIFICA-Y-C1</b>	99,63	86,18
<b>PURIFICA-Y-C8</b>	100	113,00
<b>Octil-agarose</b>	18,07	13,11

Fonte: Próprio autor (2019)

RAP: rendimento de adsorção de proteína. PtTea: Proteína teórica adsorvida.

Em que g\*sólido é dado em g<sub>sólido seco</sub> para os suportes de sílica e g<sub>sólido total</sub> para o suporte Octil-agarose.

Para fins de cálculos de adsorção os suportes de sílica foram considerados em termos de  $g_{sólido\ seco}$  enquanto para a agarose  $g_{sólido\ total}$ , conforme comumente adotado na literatura e reportado. Considerando-se que a Octil-agarose possui 95% de umidade, ou seja, apenas 5% em massa, a área de

superfície para a Octil-agarose em relação aos suportes de sílica, e a proteína teórica adsorvida é na realidade 262,2 mg/  $g_{\text{sólido seco}}$ . Assim, o baixo rendimento de adsorção possivelmente indica saturação do suporte devido à alta carga proteica para o suporte Octil-agarose.

No desenvolvimento da presente dissertação, optou-se por comparar a performance dos suportes através de isotermas de dessorção, uma vez que a afinidade entre suportes hidrofóbicos e lipases conduzia a rendimentos de adsorção altos para todos os suportes testados. Assim, como eles se distinguiam principalmente pelo desempenho na etapa de dessorção, decidiu-se fazer uma análise criteriosa da dessorção para comparação dos diferentes materiais utilizados como adsorvente. Assim, ao invés de comparar os rendimentos de dessorção obtidos para cada material com ensaios em triplicata para condições fixas, decidiu-se obter as isotermas de equilíbrio do processo de dessorção da enzima, na presença de detergente, para cada um dos materiais em análise. Dada a baixa concentração de proteína total ( $q_0$ ) nos experimentos, todas as curvas de equilíbrio foram reduzidas ao modelo linear, facilitando a análise dos resultados, conforme será mostrado no item 4.3. Desse modo, como o enfoque principal do trabalho foi a comparação por isotermas de dessorção, as discussões da próxima seção foram dedicadas a essa operação.

#### **4.3 Dessorção de BTL-2 de suportes hidrofóbicos PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 E Octil-agarose**

Estudos sobre purificação de proteínas disponíveis na literatura contemplam protocolos diversos, geralmente reportando rendimentos pontuais para avaliação da eficácia de dessorção dos suportes. As isotermas de dessorção obtidas nesse trabalho, vão além desse propósito, permitindo avaliar a influência de parâmetros como razão de lavagem e grau de hidrofobicidade sobre os índices de dessorção obtidos para cada suporte.

No cálculo do rendimento de dessorção por meio da equação 3.6 (item 3.3.10) a concentração de proteínas no sobrenadante ( $C_e$ ) é medida após a estabilização da concentração na fase líquida, ou seja, atingido o equilíbrio. Destaca-se que a concentração de proteínas teoricamente adsorvida no suporte  $q_0$  (mg/g) e a massa (g) de adsorvente contendo enzima precisam estar

calculados na mesma base. Ou seja, se  $q_0$  for definido em base seca ( $q_{0,s.s}$  em  $\text{mg/g}_{\text{sólido seco}}$  ou simplesmente  $\text{mg/g}_{s.s.}$ ), a massa  $m$  representa a massa de sólido seco. Caso contrário, se  $q_0$  estiver definido em massa úmida (sólido mais a umidade que o mesmo contém,  $q_{0,tot}$  em  $\text{mg/g}_{tot.}$ ),  $m$  deve representar a massa total.

Analisando-se a equação 3.6, nota-se que o rendimento de dessorção comumente encontrado na literatura é diretamente proporcional ao volume de batelada ( $V$ ) utilizado na etapa de dessorção. Porém, o maior volume também dessorveria mais proteína, reduzindo  $q$ , mas diluindo a proteína dessorvida (diminuindo  $C_e$ ). Assim, a relação entre rendimento e volume não é linear. Uma vez que adsorção é operação usada principalmente para concentração, tem-se como princípio que deve ser utilizado o menor volume possível, o que conduz a uma solução de compromisso entre rendimento obtido na operação e concentração da enzima. Embora essa dependência com o volume seja conhecida, não raras vezes trabalhos de purificação deixam de reportar o volume de batelada utilizado em processos de dessorção, dificultando a comparação de rendimentos entre diferentes trabalhos.

Há trabalhos na literatura que reportam rendimentos de dessorção, inclusive de 100%, sem mencionar a razão de lavagem (como ocorre em Palomo et al., 2004). Embora muitas vezes os protocolos de imobilização enzimática contemplem a proporção de 1:10  $m/v$  ( $\beta = 10$ ), foram encontrados alguns trabalhos na literatura em que essa proporção não é mantida: utilizando-se proporções de até 1:60, ou seja,  $\beta = 60$  (Mendes, 2009). Ademais, processos de dessorção não utilizam necessariamente a proporção de 1:10, inclusive é comum que a relação seja mantida em 1:5 em função de promover concentração da proteína em relação à proporção de 1:10 do processo de adsorção.

De modo geral, num sistema de dessorção em batelada (detergente adicionado ao sólido com proteína previamente adsorvida), o balanço de massa de proteínas (mg) pode ser expresso por:

$$q_0 \times m = C \times V + q \times m \quad (4.1)$$

$$q \times m = q_0 \times m - C \times V \quad (4.2)$$

$$q = q_0 - C \times \frac{V}{m} \quad (4.3)$$

Em que:

$q$  = Concentração de proteínas no suporte (mg/g)

$C$  = Concentração de proteínas no sobrenadante (mg/ml)

$q_0$  = Concentração de proteínas teoricamente adsorvidas no suporte (mg/g)

$V$  = Volume de batelada processo de dessorção (ml)

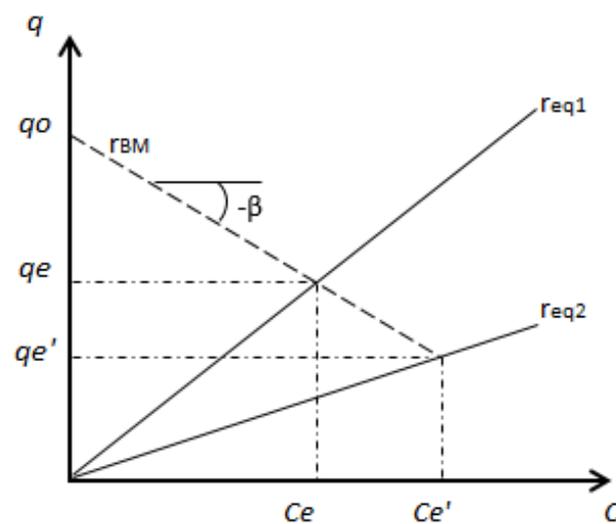
$m$  = Massa de derivado processo de dessorção (g).

Conforme dito anteriormente, para fins de simplificação, neste trabalho, a razão  $\frac{V}{m}$  empregada no processo de dessorção (denominada na dissertação de *razão de lavagem*) será denominada  $\beta$ , cuja massa pode ser expressa em termos de  $g_{\text{sólido total}}$  ou ainda  $g_{\text{sólido seco}}$ , descrito como  $\beta$  ou  $\beta_{s,s}$ , respectivamente. Assim:

$$q = -\beta C + q_0 \quad (4.4)$$

Ou seja, o balanço de massa se reduz a uma reta decrescente no plano  $q$  x  $C$ , conforme indica a Figura-4.10, onde a reta em questão é representada esquematicamente ( $r_{BM}$ ), sendo a reta pontilhada na figura a seguir.

Figura 4-10 Representação da influência de Beta no rendimento de dessorção para diferentes isotermas



Fonte: Próprio autor (2019).

Consideremos inicialmente o caso em que a concentração  $q$  é definida em base seca ( $\text{mg/g}_{\text{sólido seco}}$ ). Nos resultados da dissertação, serão analisadas as consequências dessa decisão.

Vale destacar que o lugar geométrico de todos os pontos  $(C_e, q_e)$  sob equilíbrio nas mesmas condições (temperatura e pH constantes, por exemplo) representa a isoterma de equilíbrio.

Quando se trata de adsorção hidrofóbica, a concentração de detergente ou outras substâncias menos polares que águas (como alcoóis) e a própria força iônica durante a dessorção também se tornam importantes quando se trabalha com o processo dessorativo. Comumente TRITON X-100 é utilizado como detergente para a BTL-2. Assim, as retas  $r_{eq1}$  e  $r_{eq2}$  representam o equilíbrio para dois diferentes adsorventes em condições fixas de dessorção (pH, temperatura, concentração de detergente e força iônica).

Observa-se que a cinética de dessorção ocorre sobre a reta  $r_{BM}$  (ou seja, respeitando o balanço de massa), desde que mantida a razão de lavagem  $\beta$  e a condição de proteína total  $(m, q_0)$ . Assim, a dessorção parte de  $q_0$  para o caso em que a solução de dessorção não possui proteína no seu instante inicial e o processo transcorre a medida que o par  $(C, q)$  caminha sobre  $r_{BM}$  indo em direção à isoterma para atingir o equilíbrio. O encontro entre a reta do balanço de massa e a reta de equilíbrio para o adsorvente corresponde ao final do processo de dessorção.

Assim, dado que um par  $(C_e, q_e)$  representa as composições de equilíbrio, temos que o balanço de massa de proteínas no equilíbrio leva a:

$$q_0 \times m = C_e \times V + q_e \times m \quad (4.5)$$

De onde (na junção das retas  $r_{BM}$  e  $r_{eq}$ ):

$$q_e = -\beta C_e + q_0 \quad (4.6)$$

Em que:

$q_e$  = Concentração de proteínas no suporte após o equilíbrio (mg/g)

$C_e$  = Concentração de proteínas no sobrenadante após o equilíbrio (mg/ml)

$q_0$  = Concentração de proteínas teoricamente adsorvidas no suporte (mg/g)

$\beta = \frac{V}{m}$  é a razão de lavagem em que  $m$  está expressa em g (sólido total).

Ressalta-se novamente que o valor de  $C_e$  obtido é aquele utilizado para calcular  $R_{DP}$  pela equação 3.6. A condição do sólido no processo é sempre calculada por balanço de massa, pois a análise da concentração na fase líquida é facilmente obtida. Assim, após atingir o equilíbrio, dados de  $C_e$  obtidos por meio de leitura em espectrofotômetro conforme item 3.2.2, conhecidos  $\beta$  e  $q_0$ , possibilitam o cálculo de  $q_e$  através da equação 4.6.

Porém, é possível obter suficientes pares ( $C_e$ ,  $q_e$ ) experimentalmente para diferentes valores de  $\beta$  ou  $q_0$  de modo a delinear a curva de tendência dos dados de equilíbrio no plano  $q \times C$  para condições fixas (temperatura, pH e concentração de detergente). Também é válido destacar a importância de obtenção de pelo menos um conjunto de dados de cinética do processo de dessorção, de modo a definir o tempo necessário para garantir que o equilíbrio tenha sido alcançado e assim garantir o tempo mínimo para atingí-lo.

As isotermas de equilíbrio na presença de detergente descritas (chamadas aqui simplesmente de *isotermas de dessorção*) permitem uma análise dos graus de hidrofobicidade de diferentes suportes, visto que quanto maior o ângulo de inclinação, maior a concentração de proteínas no sólido após atingido o equilíbrio, a priori indicando maior interação enzima-suporte.

A Figura-4.10 permite concluir que, partindo-se de um mesmo  $q_0$  e fixando-se  $\beta$  quanto menos inclinada a isoterma de dessorção, maior o rendimento de dessorção (conforme equação 3.6), visto que  $C_e' > C_e$ . Assim, a comparação direta de rendimentos de dessorção para definição do material que mais dessorve proteínas é válida somente se for mantida a razão de lavagem e nada mais representa do que uma comparação direta de um ponto da curva de equilíbrio de cada derivado, como segue demonstração, pois ao combinar as equações 3.6 e 4.5, obtém-se:

$$R_{DP} = \frac{C_e \times V}{C_e \times V + q_e \times m} \quad (4.7)$$

De onde:

$$R_{DP} = \frac{1}{1 + \frac{q_e \times m}{C_e \times V}} \quad (4.8)$$

Definindo-se  $\alpha = \frac{q_e}{C_e}$  (reta de equilíbrio) e retomando-se a definição  $\beta = \frac{V}{m}$ , tem-se, de forma simplificada:

$$R_{DP} = \frac{1}{1 + \frac{\alpha}{\beta}} \quad (4.9)$$

Em que  $\alpha$  é o coeficiente angular da reta de equilíbrio, apresentado na Figura (4.10) Assim,  $\alpha$  é o parâmetro que caracteriza o equilíbrio (interação proteína-adsorvente) de cada par adsorvente e proteína.

Assim, o coeficiente designado  $\beta$ , que neste trabalho expressa a razão de lavagem, pode ser correlacionado com o rendimento de dessorção através da equação 4.9. Observe que não há dependência do rendimento com a concentração inicial  $q_0$ , desde que o equilíbrio seja linear, o que representa uma vantagem em se utilizar baixas concentrações na análise de dessorção quando se compara diretamente as estatísticas de  $R_{DP}$ , como na maioria dos trabalhos.

As justificativas para se comparar diretamente as curvas de equilíbrio conforme feito no desenvolvimento da presente dissertação e não o rendimento pontual são:

- excluindo resultados fora do padrão (*outliers*), de 5 a 7 ensaios de dessorção são suficientes para definir a reta de equilíbrio (triplicatas não são necessárias, se houver tendência clara da curva), sendo que para a comparação direta dos rendimentos de todo o modo são necessário três ensaios (triplicata) para comparação estatística;
- é possível definir de modo mais preciso a confiabilidade do procedimento experimental e assim corrigir vieses nos métodos usados, já que o delineamento da curva destaca pontos fora do padrão ou grande espalhamento;
- é possível prever os resultados de concentrações e rendimento para valores de  $\beta$  e  $q_0$  não utilizados nos ensaios, reforçadas as

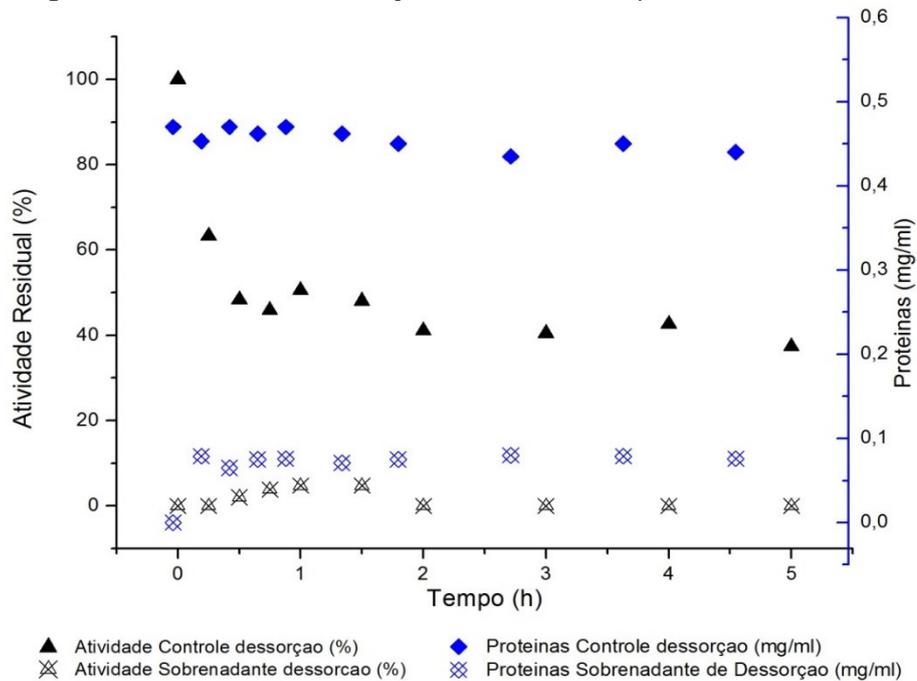
precauções e imprecisões que a extrapolação da curva de equilíbrio possa causar, quando for o caso;

- Reportar os resultados de equilíbrio garante maior comparabilidade entre diferentes trabalhos, sem a necessidade de definições de um valor de razão de lavagem padronizado para análises.

#### 4.3.1 Cinéticas de dessorção de BTL-2 em PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose.

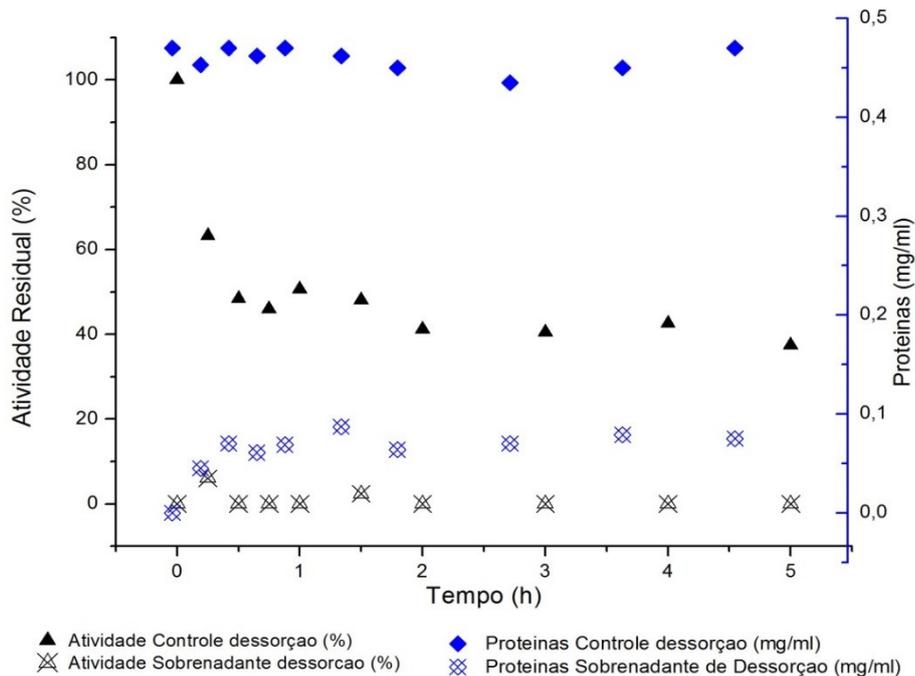
As Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 apresentam os resultados de cinética de dessorção da BTL-2 dos adsorventes utilizados.

Figura 4-11 Cinética de dessorção de BTL-2 em Suporte PURIFICA-Y-C1



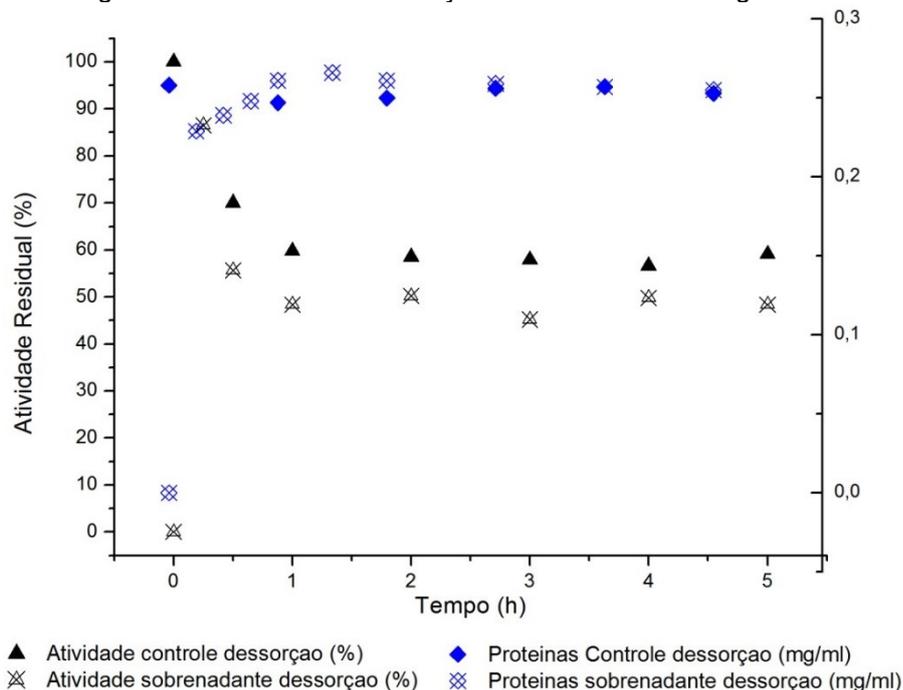
Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 4-12 Cinética de dessorção de BTL-2 em Suporte PURIFICA-Y-C8



Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 4-13 Cinética de dessorção de BTL-2 em Octil-Agarose



Fonte: Próprio autor (2019).

As cinéticas de dessorção de BTL-2 de PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose mostraram que cerca de 2h são suficientes para realizar a dessorção da BTL-2 desses suportes hidrofóbicos. De todo modo, para obtenção dos dados de equilíbrio, os ensaios de dessorção foram realizados durante 16h,

de modo a obter três medidas de concentração de proteínas (mg/ml) sucessivas como critério final para definir a estabilização das concentrações e garantir equilíbrio.

Os resultados mostram ainda que a concentração de 1%(m/v) de Triton-X-100 resulta em queda significativa de atividade após 1h de dessorção. Vale ressaltar que o procedimento experimental primava para obtenção de resultados no equilíbrio e que mais de uma hora corresponde à prolongado tempo de contato com a solução de eluição em condições de operação de purificação, provavelmente sendo desnecessários.

#### 4.3.2 Dessorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos

Para o processo de dessorção, o surfactante triton-X-100 é comumente usado para remoção de lipases de suportes hidrofóbicos. Lopes (2016) reportou 0% de rendimento de dessorção de BTL-2 do suporte de sílica-Octil com concentração de 0,2% (m/v) de Triton-X-100. Palomo, J. M. *et al.*, (2004) utilizou concentrações de até 1,5% de Triton-X-100 para purificação com a BTL-2.

Com base nesses trabalhos foi selecionada a concentração de 1% (m/v) de Triton-X para dessorção de BTL-2 dos suportes sob as mesmas condições de Lopes (2016), (tampão fosfato pH7, 5 mM, 50 rpm, 25°C).

As Tabelas 4.6 e 4.7 mostram os dados e resultados da dessorção de BTL-2 para os suportes PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose sob mesmas condições.

Tabela 4-6 Concentrações finais de enzima (TBU/L) e de proteínas (mg/L) no sobrenadante de dessorção de Lipase BTL-2 em suportes PURIFICA-Y-C1, C8 e Octil-agarose, e respectivas massas de suporte utilizadas nessa etapa ( $g_{\text{sólido}}$ ). Razão suporte/ solução = 1:10 m/v, T= 25°C, tampão fosfato 5 mM pH 7, 1% Triton X-100; durante 16 horas.

Suporte	Massa de suporte ( $g^*_{\text{sólido}}$ )	Volume de dessorção (mL)	$C_{\text{prot}_f}$ (mg /mL)	$C_{\text{enz}_f}$ $U_{\text{TBU}} / \text{mL}$
PURIFICA-Y-C1	0,81 $g_{\text{s.s}}$	8	0,05	1,92
PURIFICA-Y-C8	0,68 $g_{\text{s.s}}$	7	0,035	0
Octil-agarose	0,5 $g_{\text{s.t}}$	5	0,233	49,5

Fonte: Próprio autor (2019)

$C_{\text{enz}_f}$ : Concentração enzimática sobrenadante ao final da dessorção.

$C_{\text{prot}_f}$ : Concentração de proteínas sobrenadante ao final da dessorção.

Em que  $g^*_{\text{sólido}}$  é dado em g sólido seco para os suportes de sílica e g sólido total para o suporte Octil-agarose.

Atividade medida em 1,5h devido à inativação pela presença de Triton X-100.

Tabela 4-7. Rendimentos em enzima e proteína (%) e atividades específicas iniciais e finais na dessorção de BTL-2 em diferentes suportes hidrofóbicos utilizando Triton-X-100 1% (m/v), tampão fosfato de sódio pH 7 (5 mM) na proporção de 1:10 m/v sob agitação a 50 rpm, 25°C por 16 horas.

Suporte	Atividade	Proteína		AE0	AEF	AES	
	Dessorvida (UTBU/ $g^*$ de sólido)	Dessorvida (mg/ $g^*$ sólido)	RDE (%)	RDP (%)	(UTBU/ mg proteína)	(UTBU/ mg proteína)	(UTBU/ mg proteína)
PURIFICA-Y-C1	19,76	0,49	4,43	16,05	113,00	53,89	41,14
PURIFICA-Y-C8	0,00	0,30	0,00	7,75	113,00	53,89	0,00
Octil-agarose	494,9	2,6	86,5	98,43	230,73	129,89	190,34

Fonte: Próprio autor (2019)

RDE: Rendimento de dessorção de enzima. RDP: Rendimento de dessorção de proteínas. AE0: Atividade específica do controle no início do processo de dessorção. AEF: Atividade específica do controle ao final do processo de dessorção. AES: Atividade específica dessorvida no sobrenadante.

Em que  $g^*_{\text{sólido}}$  é dado em  $g_{\text{sólido seco}}$  para os suportes de sílica e  $g_{\text{sólido total}}$  para o suporte Octil-agarose.

Atividade medida em 1,5h devido à inativação pela presença de Triton X-100 conforme mostrado pelas cinéticas obtidas em 4.3.1.

Lopes (2016) reportou 0% de rendimento de dessorção de BTL-2 do suporte de sílica-Octil, sob as mesmas condições (tampão fosfato pH7 5mM, 50 rpm, 25°C e proporção de 1:10 m/v), porém com concentração de 0,2% de Triton-

X-100. Para essa mesma concentração de detergente, relatou ainda, rendimentos de dessorção de RDE 93,93% e RDP 52,37% para o suporte de Octil-agarose.

Para Octil-agarose, utilizando-se concentração de 1% de Triton-X-100 obteve-se RDE 86,5 e RDP 98,43 conforme Tabela-4.3; indicando que houve inativação da enzima nessa concentração de detergente, o que pode ser confirmado pela queda da atividade do controle de dessorção e pela literatura. Carrasco-López *et al.*, 2009 reporta queda para 40-50% da atividade enzimática inicial de BTL-2 na presença de 1% (m/v) de Triton-X-100.

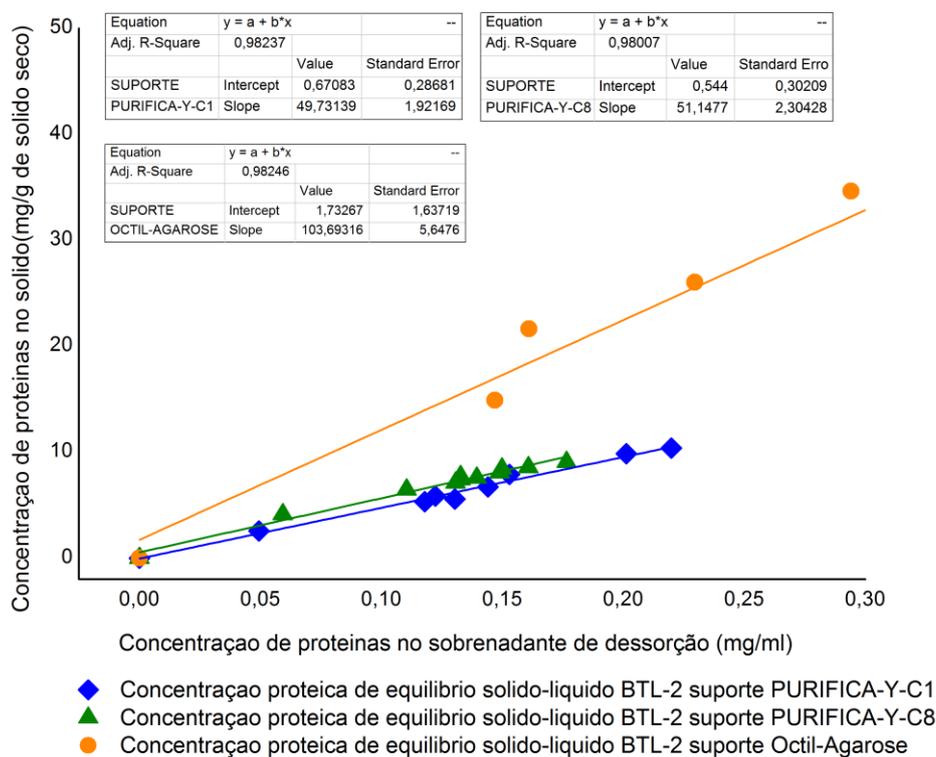
A Tabela 4.7 mostrou que houve dessorção de proteína dos suportes de sílica funcionalizada. Porém, os resultados de atividade não indicaram dessorção para a sílica-C8 devido à inativação ocasionada pelo detergente, também observada para a enzima dessorvida de Octil-agarose. Assim, em termos de atividade enzimática e aplicação na purificação seria importante utilizar concentrações mais baixas de detergente. Ainda assim, a queda na atividade promovida pelo TRITON-X ocorre por inibição competitiva, o que deve ser reduzido ou eliminado durante procedimento para remoção do detergente, conforme procedimento realizado por Palomo, J. M. *et al.*, 2004.

De todo o modo, para a análise comparativa dos adsorventes foram avaliados os dados de proteína, o que foi suficiente para o propósito do trabalho. O rendimento de dessorção de BTL-2 do suporte Octil-agarose foi significativamente melhor, o que justifica a seleção desse suporte para processos de purificação de enzimas, inclusive de BTL-2, comparativamente a outros suportes (Palomo, J. M. *et al.*, 2004).

#### 4.3.3 Isotermas de dessorção

As *isotermas de dessorção* (ou seja, adsorção na presença de detergente) da enzima BTL-2 nos suportes PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose foram obtidas conforme descrito no item 3.3.11 e 4.3. Estão representadas pela Figura 4.14. Importante destacar que nesse caso os valores de concentração de proteína no sólido estão descritos em base seca ( $q_{s.s}$  em mg/g<sub>s.s.</sub>).

Figura 4-14 Isotermas de dessorção de BTL-2 dos suportes hidrofóbicos PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose. Força iônica 5 mM pH 7, a 25 °C 50 rpm e 16 horas.



Fonte: Próprio autor (2019)

As isotermas resultantes foram satisfatoriamente ajustadas em retas, cujos parâmetros são apresentados na Tabela-4.8 a seguir:

Tabela 4-8 Parâmetros das retas obtidas pelo ajuste das isotermas de dessorção de BTL-2 dos suportes hidrofóbicos

	PURIFICA-Y-C1		PURIFICA-Y-C8		OCTIL-AGAROSE	
Parâmetro	Valor	Erro padrão	Valor	Erro padrão	Valor	Erro padrão
Intersecção	0,67	0,28	0,54	0,30	1,73	1,63
Inclinação	49,73	1,92	51,14	2,30	103,69	5,64
R <sup>2</sup>	0,98	-	0,98	-	0,98	-

Fonte: Próprio autor (2019)

A interpretação das *isotermas* de dessorção permite concluir que quanto maior o coeficiente angular da reta de ajuste, maior a concentração de proteínas no sólido em mg de proteína/g de sólido seco para uma dada concentração de proteínas no sobrenadante (mg/ml) após atingido o equilíbrio de dessorção indicando maior interação enzima-suporte e conseqüentemente mais hidrofóbico é o suporte.

O suporte Octyl-Agarose apresentou maior concentração de proteínas em  $\text{mg/g}_{\text{sólido seco}}$ , para uma dada concentração no sobrenadante ( $\text{mg/ml}$ ) visto que o coeficiente angular da reta de ajuste para esse suporte é de 103,69, praticamente o dobro dos coeficientes obtidos para os suportes de sílica PURIFICA-Y-C1 e PURIFICA-Y-C8, cujos valores são respectivamente 49,73 e 51,14.

Esse comportamento indica maior interação entre enzima-sólido desse suporte com relação aos suportes de sílica funcionalizada nas mesmas condições operacionais em sistema batelada. Assim, espera-se que ocorra maior interação hidrofóbica com a Octil-agarose.

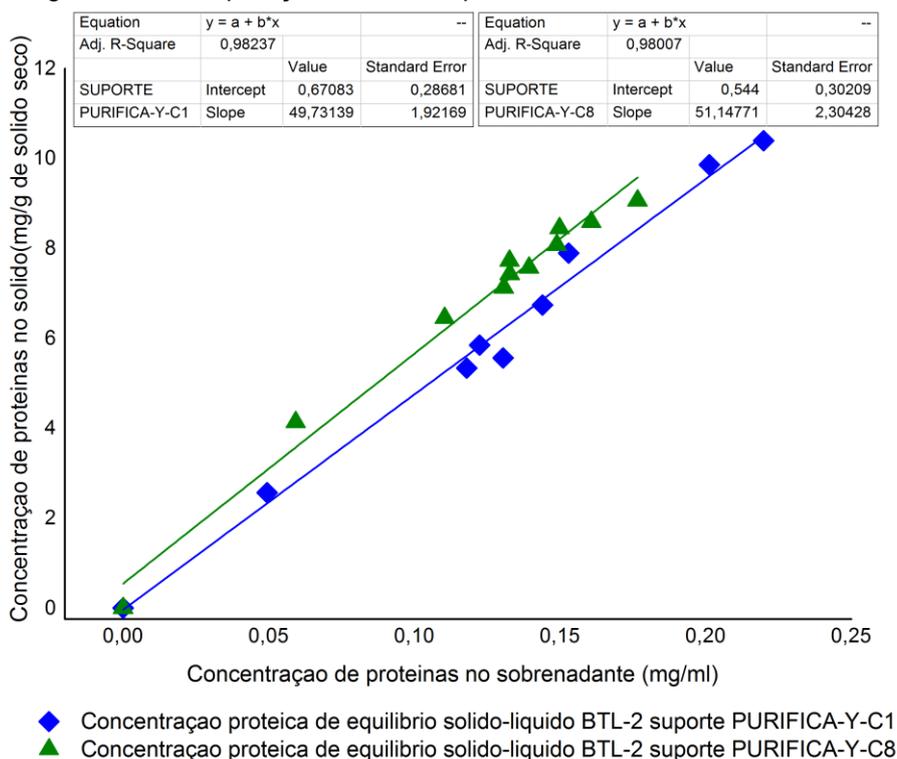
Uma primeira justificativa para a maior hidrofobicidade do suporte Octyl-Agarose com relação aos suportes com base em sílica seria o grupo funcional existente na superfície de cada adsorvente. Porém, o adsorvente PURIFICA-Y-C8 possui o mesmo grupo que a Octyl-Agarose

A densidade de grupos funcionais Octil dos suportes Octyl-Agarose e PURIFICA-Y-C8 também deve ser considerada. Bastida e colaboradores reportaram em 1998 que, após a ativação, a Octyl-Agarose 4B comercial torna-se um suporte altamente ativado contendo  $40 \mu\text{mol}$  de grupos Octil por  $\text{mL}$  de suporte. Segundo Kopp Technologies, fabricante do suporte PURIFICA-Y-C8, a densidade de grupos Octil na superfície desse suporte é de  $142 (\mu\text{mol/g}_{\text{sól.seco}})$ .

Para colocarmos a densidade de grupos em mesma base de cálculo, é preciso lembrar que os  $40 \mu\text{mol}$  reportados para Octil-agarose se encontram ativando um material de porosidade muito superior. Para se ter uma ideia, a umidade da sílica ativada está em geral pouco abaixo dos 50% em base úmida, enquanto da agarose chega a 95%. Assim, considerando a densidade da Octil-agarose aproximadamente  $0,95 \text{ g}_{\text{tot}}/\text{mL}_{\text{tot}}$  e a concentração de  $0,05 \text{ g}_{\text{sól.seco}}/\text{g}_{\text{tot}}$ , é possível obter que a concentração de grupos Octil na agarose ativada chega à cerca de  $842 \mu\text{mol/g}_{\text{sól.seco}}$ . Assim, espera-se que a densidade de grupos C8 seja muito maior na agarose do que na sílica (cerca de 5,93 vezes). Vale destacar que a concentração de grupos Octil na agarose chega próximo à concentração de grupos metil na sílica, que corresponde à  $727 \mu\text{mol}$  de C1/ $\text{g}_{\text{sól.seco}}$  (PURIFICA-Y-C1). Deste modo, a densidade de grupos Octil na agarose justifica maior interação hidrofóbica do que na sílica-C8 (PURIFICA-Y-C8), enquanto a densidade aliada à cadeia carbônica mais longa garante maior interação hidrofóbica do que a observada para a sílica-C1 (PURIFICA-Y-C1).

Ao comparar as isotermas de dessorção dos suportes de sílica PURIFICA-Y-C1 e PURIFICA-Y-C8, obteve-se retas com coeficiente angulares próximos de 49,73 e 51,14, respectivamente, mostrando que são similares em termos afinidade pela enzima BTL-2 na presença de 1% (m/v) de Triton-X-100, conforme Figura 4.15.

Figura 4-15 Comparação entre os suportes PURIFICA-Y-C1 E PURIFICA-Y-C8.



Fonte: Próprio autor (2019)

A similaridade entre os suportes de sílica PURIFICA-Y-C1 e PURIFICA-Y-C8 pode residir no fato de que apesar de o grupo Octil ser mais hidrofóbico que o metil, devido ao tamanho de sua cadeia carbônica, há menor quantidade de grupos Octil na superfície do adsorvente PURIFICA-Y-C8 que metil em PURIFICA-Y-C1, responsáveis pela interação com a enzima BTL-2, cujas concentrações de grupos funcionais é de 727 ( $\mu\text{mol/g}$ ) para o PURIFICA-Y-C1 e de 142 ( $\mu\text{mol/g}$ ) para o PURIFICA-Y-C8 (Kopp Technologies).

Porém, mesmo com uma interação enzima-sólido maior, a Octil-agarose apresenta maiores rendimentos de dessorção nas condições de ensaio utilizadas, conforme já foi destacado. Este resultado é corroborado por trabalhos anteriores, conforme indica a revisão bibliográfica da dissertação, ou seja, a matriz agarose ativada com Octil é um melhor dessorvente do que a sílica-octil, apresentando

maiores concentrações desorvidas para as mesmas condições de partida (mesma massa total de proteína ( $m_{q0}$ ). Esta aparente contradição tem fundamento na definição do parâmetro  $\beta$ , que leva em consideração a razão de lavagem (volume da batela/massa de adsorvente) no processo de desorção.

Ocorre que a razão de lavagem para ensaios de desorção costuma ser definido em base úmida para a agarose e base seca para a sílica, uma vez que a Octil-agarose é comercializada em solução, enquanto a sílica funcionalizada costuma ser encontrada seca.

Ao considerar um volume fixo de lavagem para uma mesma massa total de suporte para desorção em batelada, a quantidade de solvente para lavagem da massa de agarose é muito maior em termos de volume de solvente / massa seca de suporte. Por exemplo, razões de lavagem comuns no presente trabalho foram de  $0,5 \text{ g}_{\text{sól.tot}} \text{ de Octil-agarose} : 5\text{mL de meio de desorção}$ ; enquanto a razão para sílica era  $0,5 \text{ g}_{\text{sól.seco}} \text{ de sílica-Cx} : 5\text{mL de meio de desorção}$ . Neste caso, a razão de lavagem ( $\beta$ ) definida em base seca para comparação (mL de desorção/ $\text{g}_{\text{sól.seco}}$ ) corresponde à  $100 \text{ mL/g}_{\text{sól.seco}}$  para a Octil-agarose e  $10 \text{ mL/g}_{\text{sól.seco}}$  para sílicas funcionalizadas. Neste mesmo caso, é possível definir que o ensaio com Octil-agarose utiliza cerca de 3,7 vezes mais moles de solvente (água e detergente) por mol de grupo de ativação do que o ensaio com sílica ativada com C8 utiliza por mol de grupo de ativação.

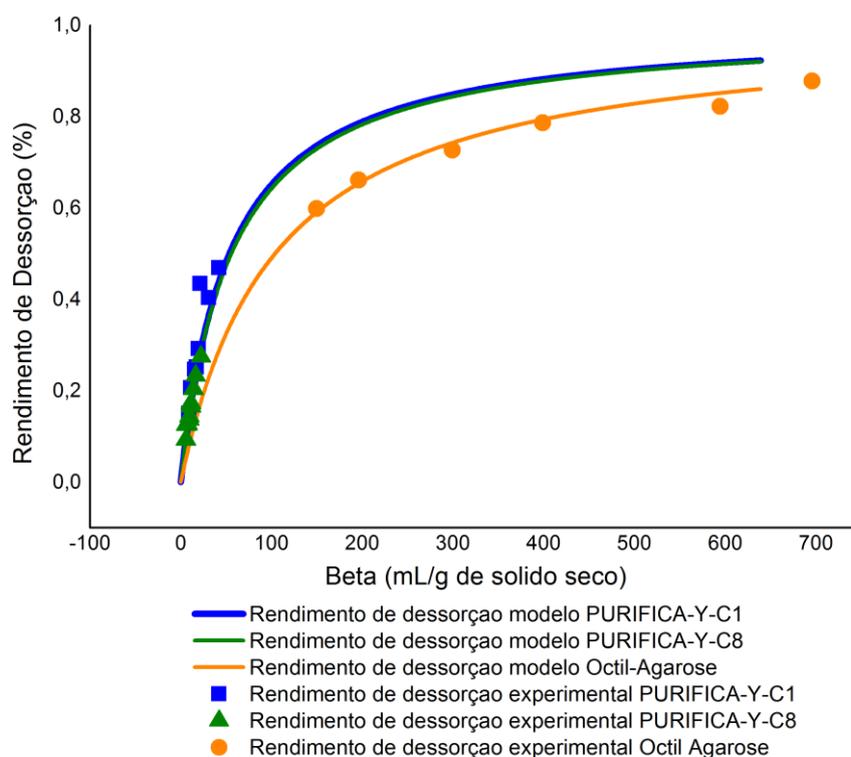
Assim, a lavagem da Octil-agarose costuma ser realizada com uma proporção molar de *solvente : grupo funcional na superfície* muito maior do que o que é feito para sílica. Como a razão de lavagem é distinta em base seca, o maior rendimento de desorção somente indica o material que mais desorve proteínas nas condições utilizadas e não a maior interação enzima-adsorvente. Ou seja, a razão de lavagem desloca o equilíbrio para desorção, mesmo sendo a interação enzima-sólido maior na Octil-agarose. Esta explicação justifica porque o trabalho de Lopes (2016) não obteve bons resultados de desorção para sílicas funcionalizadas, mesmo reduzindo o grau de ativação dos materiais de sílica com C8.

A expressão 4.9, dada por  $R_{DP} = \frac{1}{1 + \frac{\alpha}{\beta}}$ , explicita a correlação entre  $\beta$  e  $R_{DP}$  mostrando que quanto maior  $\beta$ , maior o rendimento de desorção, de modo que para  $\beta \rightarrow \infty$ ,  $R_{DP} \rightarrow 1$  (o mesmo ocorre se  $\alpha \rightarrow 0$ ).

#### 4.3.4 Influência da razão de lavagem no rendimento de dessorção

A correlação  $\beta$  e o rendimento de dessorção de proteínas podem ser representados graficamente pelos dados experimentais obtidos ao utilizar a equação 4.9, desprezando o coeficiente independente ajustado na reta da Tabela 4.8 e considerando o coeficiente ângular da reta uma estimativa para o parâmetro  $\alpha$  do equilíbrio, conforme a seguir (Figura 4.16).

Figura 4-16 Variação do rendimento de dessorção com Beta. Dados experimentais e modelo previsto.



Fonte: Próprio autor (2019)

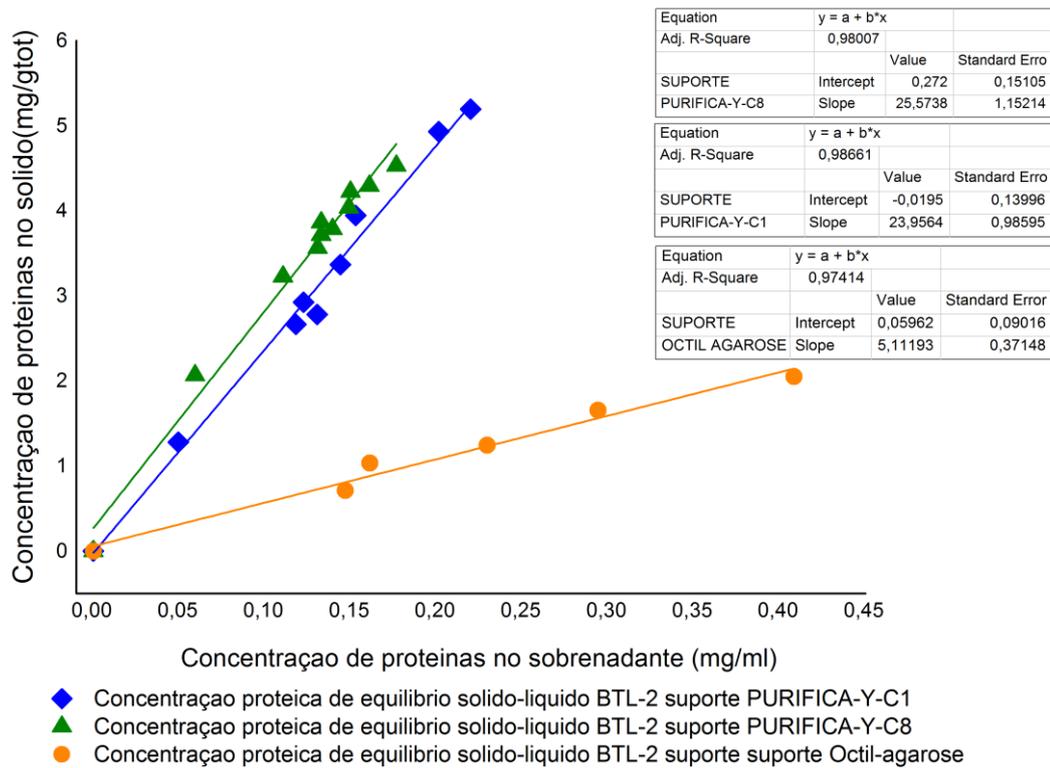
A Figura-4.16 indica a tendência esperada de que em altas razões de lavagem ( $\beta$ ) a tendência é obter 100% de rendimento de dessorção para processo em batelada em que as interações resultantes da adsorção sejam reversíveis. Ao se observar a localização dos pontos experimentais, também fica clara a tendência de se aplicar maiores razões de lavagem em base seca (mL/g<sub>sól.seco</sub>) para os ensaios com Octil-agarose.

Considerando que a purificação de enzimas é uma operação de concentração, torna-se desvantajoso utilizar volume de dessorção elevado em

sistema batelada. Isso justifica a maior eficácia do suporte Octil-agarose em batelada, que para um mesmo volume corresponde a uma razão de lavagem bem maior em base seca do que os suportes de sílica funcionalizada. Assim, o maior rendimento de dessorção e portanto melhor aproveitamento em batelada podem ser ocasionados pela porosidade da própria partícula e não necessariamente pela química de superfície do suporte, que aponta na direção de maior hidrofobicidade, conforme já justificado.

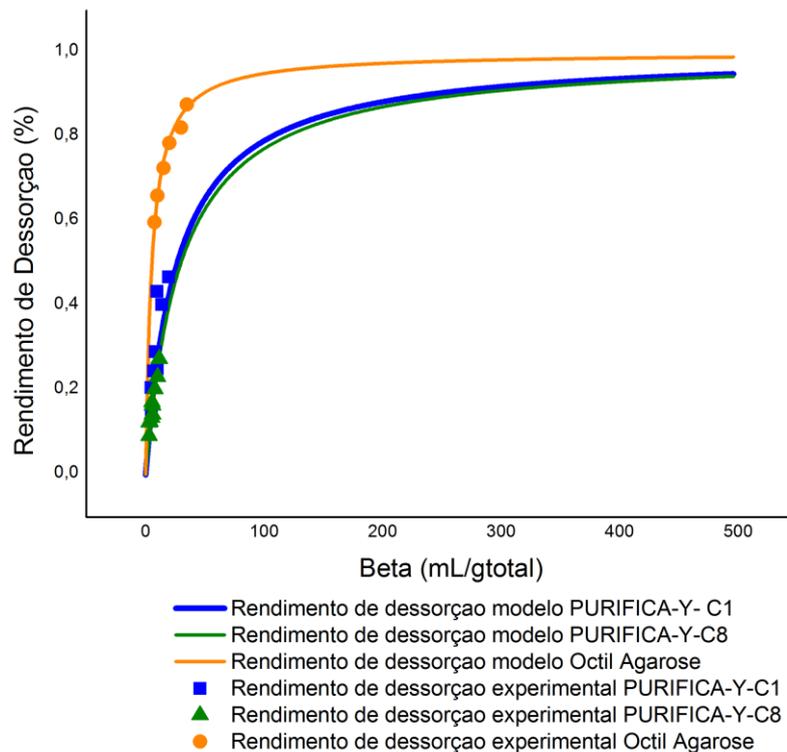
De modo a demonstrar esta característica, pode-se utilizar os mesmos dados experimentais para ajustar as retas de equilíbrio com concentrações na fase sólida em base úmida e considerando-se a razão de lavagem ( $\beta$ ) em base úmida ( $\text{mL/ g}_{\text{tot}}$ ), mais comum na prática experimental. Conforme a Figura 4.17 e Figura 4.18 indicam que ocorre uma inversão de comportamento, resultando numa inversão das isotermas e rendimentos. Mas vale ressaltar que nesse caso está implícito nos gráficos que a razão de lavagem utilizada resulta em relação molar muito maior de solvente por grupo de ativação para a agarose do que para adsorventes baseados em sílica. Assim, os dados em base úmida são um indicativo de adsorvente mais apto à concentração de proteínas na etapa de dessorção, mas não necessariamente um indicativo de maior interação proteína-adsorvente.

Figura 4-17 Isotermas de dessorção C1, C8 e Octil-agarose em base úmida.



Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 4-18 Variação do rendimento de dessorção com Beta. Dados experimentais e modelo previsto.



Fonte: Próprio autor (2019)

Deste modo, conforme as práticas experimentais da literatura já demonstram, a Octil-agarose possui dessorção facilitada. Assim, suportes de sílica funcionalizados com grupos carbono demonstraram-se menos vantajosos para processos de concentração da lipase BTL-2 em batelada, por apresentarem menores rendimentos para um mesmo volume de dessorção.

Ainda assim, adsorventes de sílica possuem diversas vantagens, entre elas a resistência química e também mecânica. Além disso, os adsorventes com base em sílica têm ganhado destaque na literatura geral como forma de obtenção de partículas mesoporosas controladas e compósitos magnéticos. A sílica possui diversas vantagens em relação à outras matrizes sólidas, entre elas está o potencial de moldagem dos poros e das partículas, podendo oferecer uma gama diversificada de morfologias e estruturas porosas. Assim, é de interesse geral que materiais ativados de sílica possam ser aprimorados para diversas aplicações, entre elas: separação e imobilização de enzimas por hidrofobia. As constatações do mestrado possuem apelo tecnológico, pois indicam caminhos para melhoria dos materiais baseados em sílica.

#### 4.3.5 Sumário das discussões obtidas da dessorção de BTL-2 com derivado obtido a partir de extrato e implicações sobre o material

Foi possível verificar que os suportes de sílica ativada com grupos funcionais de carbono utilizados apresentaram menor interação enzima-sólido do que a Octil-agarose.

Porém, no caso da separação, os suportes hidrofóbicos de sílica ativada utilizados apresentaram piores resultados de dessorção para BTL-2, mesmo com a menor interação enzima-sólido indicada nos resultados. A explicação para esse aparente paradoxo reside na porosidade dos sólidos utilizados, já que a sílica é bem menos porosa e a razão de lavagem possui influência na saturação final alcançada pelo processo dessorativo. Assim, tais materiais apresentam um desempenho inferior ao da Octil-agarose em bateladas para concentração de BTL-

2. Há essencialmente duas alternativas de melhoria:

- 1 – ampliar a porosidade dos silicatos;
- 2 – alterar a química de superfície.

A primeira opção esbarra em dificuldades de síntese e polimerização.

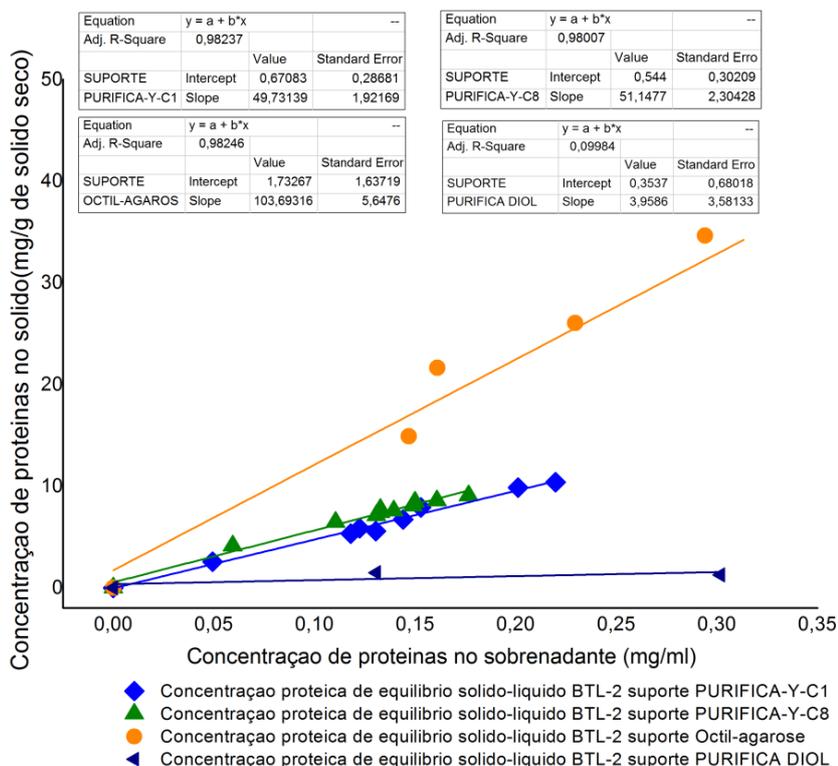
Além disso, a obtenção de materiais mais porosos também pode prejudicar sua resistência mecânica. Quanto à segunda alternativa, nem mesmo o material com C1, obteve resultados melhores, mesmo porque a diminuição da cadeia acabou conferindo maior densidade de grupos. Assim, torna-se necessário utilizar grupos distintos, que sejam ainda menos hidrofóbicos. Com essa intenção, ensaios preliminares foram realizados com material ativado com DIOL, conforme apresenta a seção seguinte.

Também foi avaliado o papel da temperatura na isoterma, procurando analisar se seu aumento seria efetivo para estimular o processo de dessorção.

#### 4.3.6 Ensaios preliminares suporte sílica-DIOL

Adicionalmente, foram realizados alguns ensaios preliminares com suporte de sílica funcionalizado com o grupo DIOL, afim de melhorar a eficácia do processo de dessorção de BTL-2 de suportes de sílica, devido a menor hidrofobicidade desse grupo comparativamente a grupos de carbono, conforme Figura 4.19.

Figura 4-19 Isotermas de dessorção de BTL-2 contendo ensaios preliminares do DIOL



Fonte: Próprio autor (2019)

O DIOL apresentou significativa melhor dessorção da BTL-2 com relação aos demais suportes de sílica, conforme Tabela 4.9.

Tabela 4-9 Rendimentos em enzima e proteína (%) e atividades específicas iniciais e finais na dessorção de BTL-2 em diferentes suportes utilizando Triton-X-100 1% (m/v), tampão fosfato de sódio pH 7 (5 mM) na proporção de 1:10 m/v sob agitação a 50 rpm, 25°C por 16 horas.

Suporte	Atividade	Proteína			AE0	AEF	AES
	Dessorvida (UTBU/g* de sólido)	Dessorvida (mg/ g* de sólido)	RDE (%)	RDP (%)	(UTBU/ mg proteína)	(UTBU/ mg proteína)	(UTBU/ mg proteína)
<b>PURIFICA-Y-C1</b>	19,76	0,49	4,43	16,05	113,00	53,89	41,14
<b>PURIFICA-Y-C8</b>	0,00	0,30	0,00	7,75	113,00	53,89	0,00
<b>Octil-agarose</b>	494,9	2,6	86,5	98,43	230,73	129,89	190,34
<b>PURIFICA DIOL</b>	229,51	2,97	10,31	73,04	113,00	53,89	77,14

Fonte: Próprio autor (2019)

RDE: Rendimento de dessorção de enzima. RDP: Rendimento de dessorção de proteínas. AE0: Atividade específica do controle no início do processo de dessorção. AEF: Atividade específica do controle ao final do processo de dessorção. AES: Atividade específica dessorvida no sobrenadante.

Em que g\*sólido é dado em g<sub>sólido seco</sub> para os suportes de sílica e g<sub>sólido total</sub> para o suporte Octil-agarose.

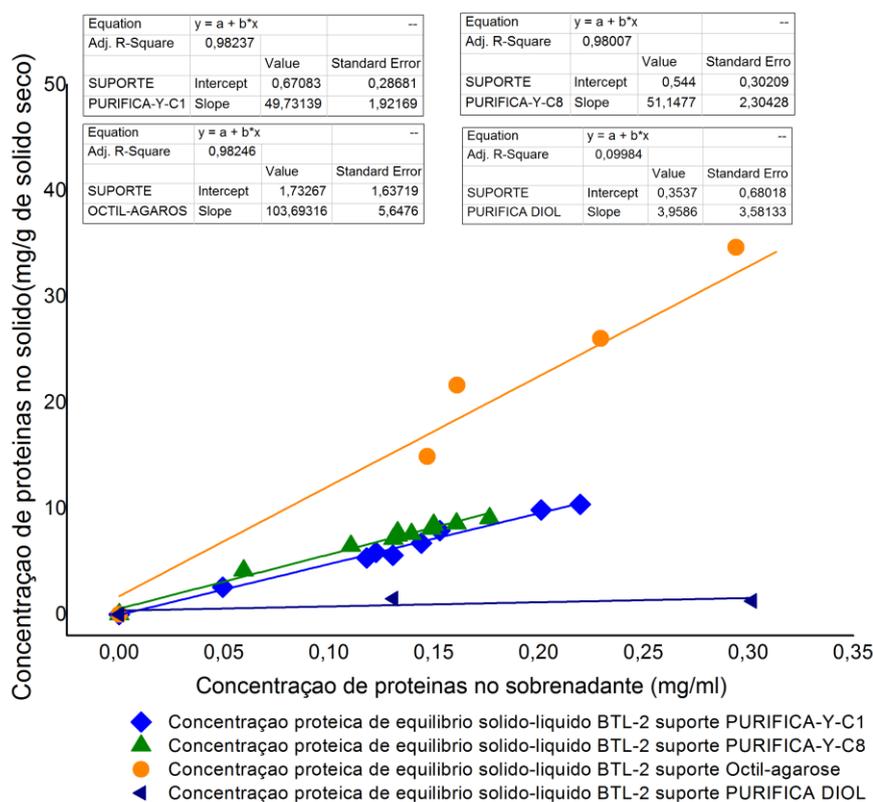
Atividade enzimática medida em 1,5h devido à inativação pela presença de Triton X-100.

O fato de o grupo DIOL ser significativamente menos hidrofóbico que os grupos de carbono, resultou em aumento significativo do rendimento de dessorção em termos de proteínas com relação ao suportes de sílica funcionalizados com grupos C1 e C8. Em termos de enzimas, o suporte DIOL apresentou rendimento de dessorção baixo. Uma possível explicação deve-se ao fato de a BTL-2 ser bastante hidrofóbica, conforme exposto no item 2.3 e o suporte DIOL, por ser mais hidrofílico devido à presença de grupos OH, apresentar mais afinidade com as proteínas contaminantes menos hidrofóbicas. Isso pode indicar que o suporte DIOL seja menos seletivo com relação a lipase de interesse, porém a realização de outros ensaios com o suporte DIOL torna-se necessária para maiores conclusões.

#### 4.3.7 Efeito da temperatura na dessorção do suporte PURIFICA-Y-C8

Dos suportes utilizados para adsorção/dessorção da BTL-2, PURIFICA-Y-C8 apresentou menor índice de dessorção (maior coeficiente angular). Considerando que a dessorção trata-se de um fenômeno endotérmico, foram ainda realizados ensaios com o suporte PURIFICA-Y-C8 à temperatura de 37°C afim de avaliar a influência da temperatura na dessorção de BTL-2 desse suporte, conforme Figura 4.20.

Figura 4-20 Isotermas de dessorção de BTL-2 contemplando ensaios para avaliação do efeito de temperatura para o suporte PURIFICA-Y-C8 de 25 para 37 °C.



Fonte: Próprio autor (2019)

Pôde-se observar que o aumento da temperatura de 25°C para 37°C variou o coeficiente angular da reta de 51,14 para 46,89. Assim, houve aumento da dessorção, o que era esperado, já que o processo de dessorção é um fenômeno endotérmico. Porém a figura permite concluir que esse parâmetro não impacta de forma tão significativa os rendimentos de dessorção da enzima BTL-2 adsorvida em PURIFICA-Y-C8.

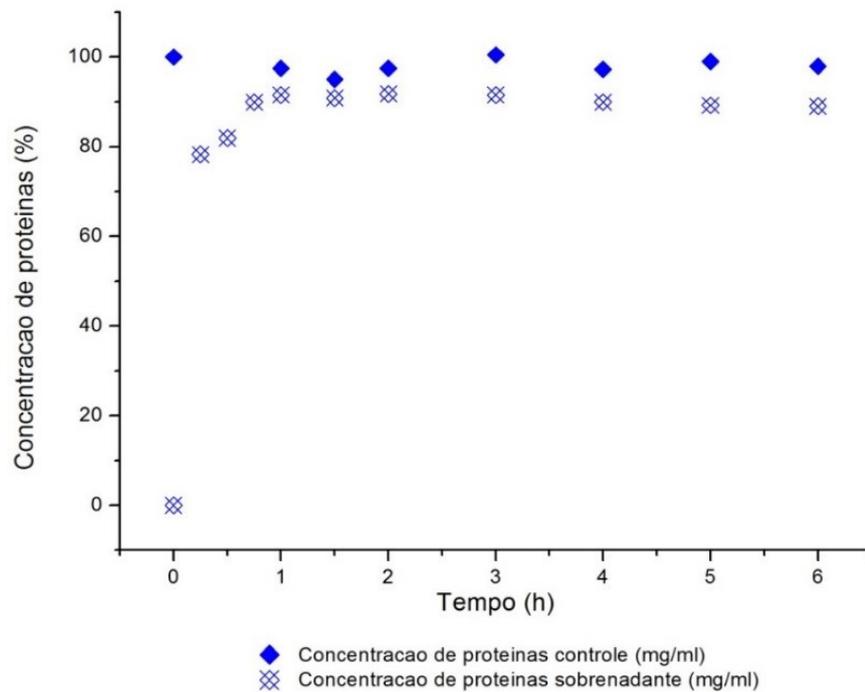
Foram ainda avaliadas isotermas de dessorção sob as mesmas condições

para a lisozima de modo a caracterizar a influência do grau de hidrofobicidade na interação enzima-sólido para uma enzima de alta pureza e menor tamanho, conforme item 4.3.10.

#### 4.3.8 Cinéticas de dessorção de Lisozima em PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose.

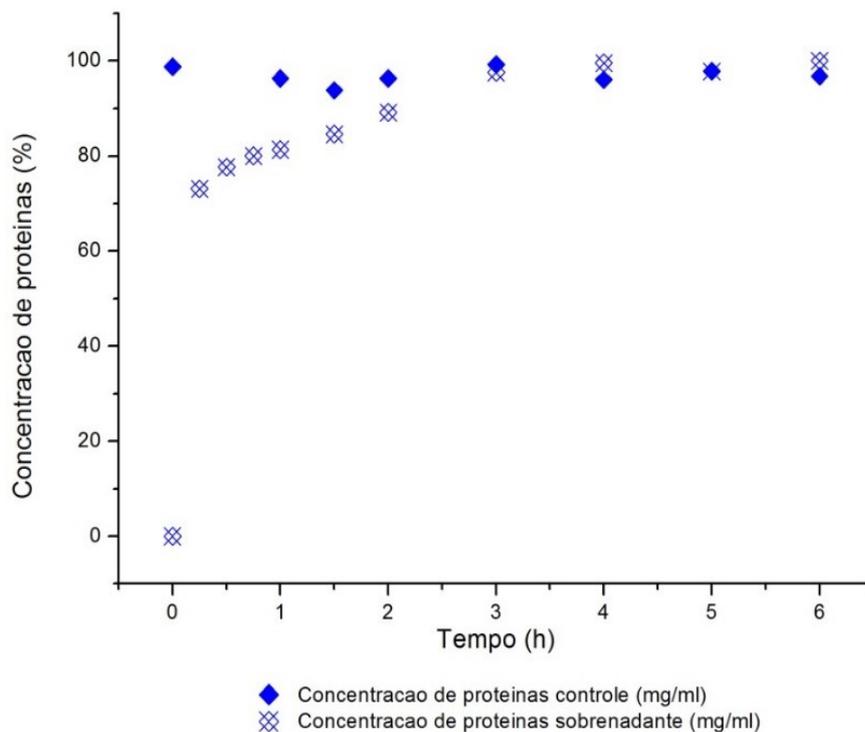
As Figuras 4.21, 4.22 e 4.23 apresentam os resultados de cinética de dessorção da lisozima dos adsorventes utilizados.

Figura 4-21 Cinética de dessorção de Lisozima em Suporte PURIFICA-Y-C1



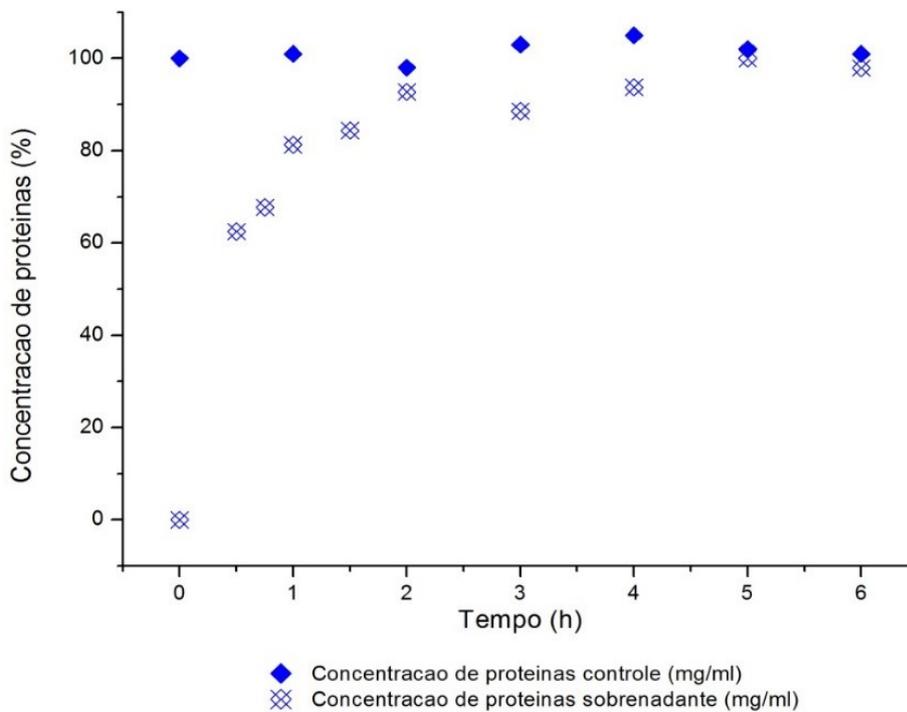
Fonte: próprio autor (2019)

Figura 4-22 Cinética de dessorção de Lisozima em Suporte PURIFICA-Y-C8



Fonte: próprio autor (2019)

Figura 4-23 Cinética de dessorção de Lisozima em Suporte Octil-agarose



Fonte: próprio autor (2019)

As cinéticas de dessorção de Lisozima de PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose mostraram que cerca de 2h são suficientes para realizar a dessorção da enzima desses suportes hidrofóbicos. Aqui, para obtenção dos dados de equilíbrio, os ensaios de dessorção também foram realizados durante 16h, visando garantir que o equilíbrio fosse atingido, visto que esse é função da concentração e diferentes concentrações enzimáticas foram utilizadas. Ao longo dos ensaios de equilíbrio, vale destacar novamente que três medidas de concentração foram utilizadas como critério final para definir a estabilização das concentrações.

#### 4.3.9 Dessorção de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos

A Tabela-4.10 E 4.11 sumariza os resultados de rendimento de dessorção de Lisozima para os suportes PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose.

Tabela 4-10 Concentrações finais de proteínas (mg/L) no sobrenadante de dessorção de lisozima em suportes PURIFICA-Y-C1, C8 e Octil-agarose, e respectivas massas de suporte utilizadas nessa etapa ( $g_{\text{sólido}}$ ). Razão suporte/ solução = 1:200 m/v, T= 25°C, tampão fosfato 25 mM pH 7, 1% Triton X-100; durante 16 horas.

<b>Suporte</b>	<b>Massa de suporte (<math>g^*_{\text{sólido}}</math>)</b>	<b>Volume de dessorção (mL)</b>	<b><math>C_{\text{prot}_f}</math> (mg /mL)</b>
<b>PURIFICA-Y-C1</b>	0,0224 $g_{\text{s.s}}$	5	0,342
<b>PURIFICA-Y-C8</b>	0,0243 $g_{\text{s.s}}$	5	0,375
<b>Octil-agarose</b>	0,05 $g_{\text{s.t}}$	10	0,062

Fonte: Próprio autor (2019)

$C_{\text{enz}_f}$ : Concentração enzimática sobrenadante ao final da dessorção.

$C_{\text{prot}_f}$ : Concentração de proteínas sobrenadante ao final da dessorção.

Em que  $g^*_{\text{sólido}}$  é dado em  $g_{\text{sólido seco}}$  para os suportes de sílica e  $g_{\text{sólido total}}$  para o suporte Octil-agarose.

Tabela 4-11 Rendimentos de dessorção em proteína (%) de Lisozima em diferentes suportes hidrofóbicos utilizando Triton-X-100 1% (m/v), tampão fosfato de sódio pH 7 (25 mM) na proporção de 1:200 m/v sob agitação a 50 rpm, 25°C por 16h.

<b>Suporte</b>	<b>Proteína Dessorvida (mg/g* suporte)</b>	<b>RDP (%)</b>
<b>PURIFICA-Y-C1</b>	76,33	88,61
<b>PURIFICA-Y-C8</b>	69,66	87,36
<b>Octil-agarose</b>	12,33	90,07

Fonte: Próprio autor (2019)

RDP: Rendimento de dessorção de proteínas.

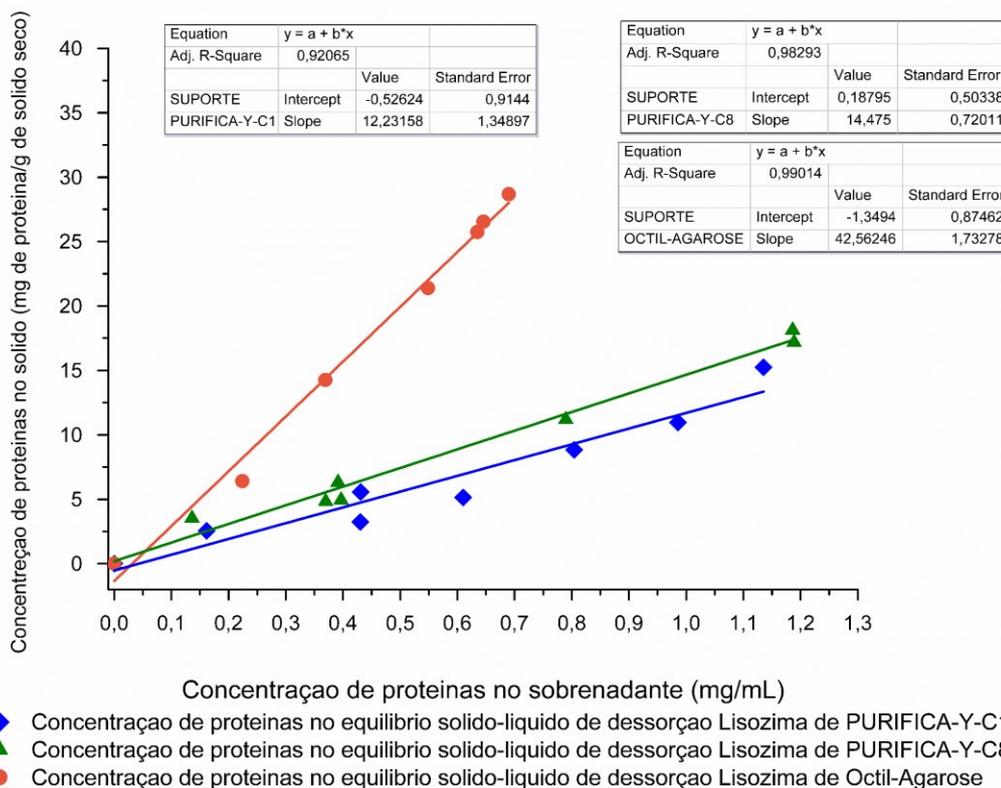
Os resultados altos rendimentos de dessorção obtidos para todos os suportes confirmam a tendência prevista pela figura 4.16 de que em altas razões de lavagem ( $\beta$ ) a tendência é obter 100% de rendimento de dessorção para processo em batelada em que as interações resultantes da adsorção sejam reversíveis.

Aqui vale ressaltar que como a Lisozima trata-se de uma enzima com alto grau de pureza, o rendimento de dessorção de proteínas equivale essencialmente ao rendimento de dessorção de enzima.

#### 4.3.10 Isotermas de dessorção Lisozima

As *isotermas de dessorção* (ou seja, adsorção na presença de detergente) da enzima Lisozima nos suportes PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose foram obtidas conforme descrito no item 3.3.12. Estão representadas pela Figura 4.24. Importante destacar que nesse caso os valores de concentração de proteína no sólido estão descritos em base seca ( $q_{s,s}$  em g/g<sub>s.s.</sub>).

Figura 4-24 Isotermas de dessorção de Lisozima dos suportes hidrofóbicos PURIFICA-Y-C1, PURIFICA-Y-C8 e Octil-agarose. Força iônica 25 mM pH 7, a 25°C 50 rpm e 16 horas.



Fonte: Próprio autor (2019)

As isotermas resultantes dos ensaios de dessorção de Lisozima também foram satisfatoriamente ajustadas em retas, cujos parâmetros são apresentados na Tabela-4.12 a seguir:

Tabela 4-12 Parâmetros das retas obtidas pelo ajuste das isotermas de dessorção de Lisozima dos suportes hidrofóbicos

	PURIFICA-Y-C1		PURIFICA-Y-C8		OCTYL-AGAROSE	
Parâmetro	Valor	Erro padrão	Valor	Erro padrão	Valor	Erro padrão
Intersecção	-2,05	1,21	-2,76	2,51	-2,00	5,57
Inclinação	36,24	3,91	57,66	8,47	824,66	43,75
R <sup>2</sup>	0,92	-	0,90	-	0,97	-

Fonte: Próprio autor (2019)

O suporte Octyl-Agarose apresentou maior concentração de proteínas em mg/g<sub>sólido seco</sub>, para uma dada concentração no sobrenadante (mg/ml) visto que o coeficiente angular da reta de ajuste para esse suporte é de 824,66, significativamente maior que coeficientes obtidos para os suportes de sílica funcionalizada PURIFICA-Y-C1 e PURIFICA-Y-C8, cujos valores são

respectivamente 36,24 e 57,66.

Esse comportamento reafirma o indicativo de maior interação hidrofóbica entre enzima-sólido desse suporte com relação aos suportes de sílica funcionalizada com grupos C1 e C8 nas mesmas condições operacionais dos ensaios realizados para obtenção das isotermas para BTL-2.

#### **4.4 Influência do pH e força iônica na adsorção e dessorção de Lisozima de PURIFICA-Y-C8**

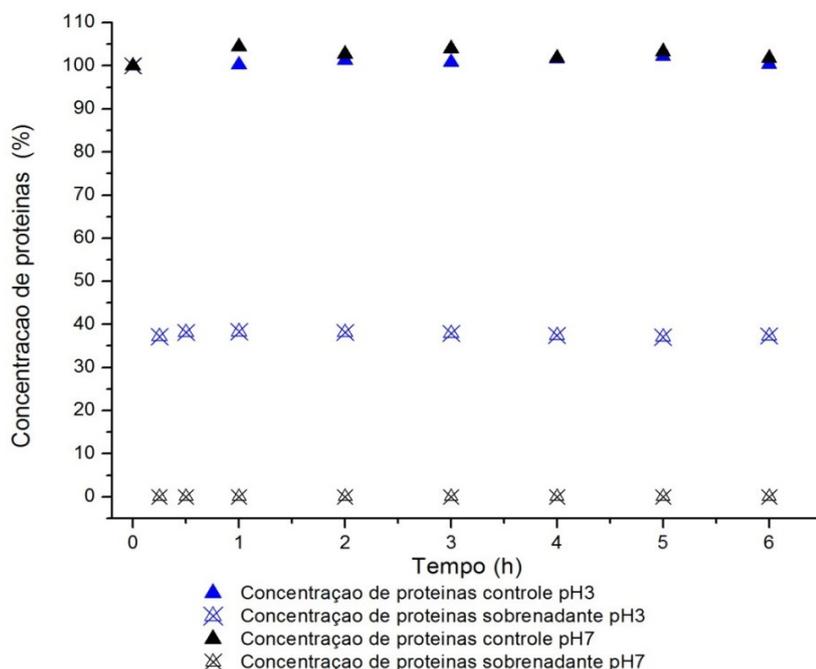
##### **4.4.1 Adsorção de lisozima em sílica pura pHs 3 e 7**

Conforme descrito no item 2.5.5, a sílica pura possui grupos silanóis em sua superfície, resultantes do processo de síntese. O ponto isoelétrico da sílica se encontra em torno de 2,0. Assim a sílica possui carga fortemente negativa em valores de pH acima de 3 (ILER, 1979).

A lisozima possui carga líquida positiva quando o pH do meio é inferior ao ponto isoelétrico da proteína, estimado em 11 (Bhattacharyya *et al.*, 2010). Aliada à carga negativa da superfície da sílica, espera-se que as forças eletrostáticas favoreçam a adsorção iônica da lisozima.

A fim de avaliar a influência dos grupos silanóis carregados negativamente na adsorção iônica da lisozima foi realizada a cinética de adsorção dessa enzima em sílica pura em pH 3 e 7. Foram obtidos rendimentos de adsorção de proteínas RAP de 62,67 e 100% para os pH 3 e 7 respectivamente, conforme Figura - 4.25.

Figura 4-25 Cinética de adsorção de Lisozima em sílica pura pH 3 e 7



Fonte: Próprio autor (2019)

A quantidade de enzima adsorvida variou significativamente em função do pH do meio reacional, com o melhor desempenho alcançado em pH 7,0. Como visto anteriormente, a lisozima possui carga líquida positiva, quando o pH do meio é inferior ao ponto isoelétrico da proteína e em teoria encontra-se mais carregada positivamente em pH 3, porém nesse pH a superfície de sílica dispõe de uma quantidade menor de silanóis carregados para interagir eletrostaticamente com a enzima. Assim, a adsorção iônica é desfavorecida em pH ácido, conforme demonstrado nos ensaios.

Considerando-se ainda que a interação eletrostática tende a diminuir quando a força iônica do meio aumenta, foram realizados ensaios de dessorção de lisozima de PURIFICA-Y-C8 em força iônica 25 mM e 200 mM afim de verificar a influência iônica para os pH 3 e 7.

#### 4.4.2 Influência da força iônica na dessorção de Lisozima de PURIFICA-Y-C8

Tabela 4-13 Variação da força iônica para a dessorção de Lisozima em pH 3 e 7. Razão de dessorção (m/v) **1:10**; 25°C; 50rpm; durante 16h; 1% de Triton X-100.

Força Iônica	pH 3		pH 7	
	25mM	200mM	25mM	200mM
RDP	45,4±1,88	29,2±1,69	0*	0*

Fonte: Próprio autor (2019)

RDP: Rendimento de dessorção de proteínas (%)

\*Valores obtidos dentro da faixa de erro do equipamento.

A maior força iônica do meio reduziu a dessorção para o pH 3,0. Isto ocorre possivelmente porque a maior força iônica do meio promove um aumento da interação hidrofóbica com a sílica, que se encontra mais próxima da neutralidade de sua superfície. Já para o pH 7 não houve influência do aumento da força iônica no rendimento de dessorção, indicando que as interações eletrostáticas são mais relevantes nesse pH, corroborando os resultados obtidos para a sílica pura no item que demonstraram que para um pH próximo ao pI da sílica em que a superfície tende a ser neutra a adsorção diminui significativamente, devido à redução de forças eletrostáticas. Além disso, os rendimentos de dessorção obtidos para a sílica funcionalizada (PURIFICA-Y-C8) em pH 3 e 7 apresentaram diferenças significativas, indicando que de fato o processo de adsorção-dessorção em sílica é misto, ou seja, contempla interações iônicas e hidrofóbicas.

Como as isotermas de dessorção deste trabalhos foram obtidas em pH 7, de fato a dificuldade de dessorção das enzimas dos suportes de sílica também pode estar relacionada à existência de interações eletrostáticas, conforme hipótese levantada por LOPES, 2016 de que o processo de adsorção através de dois mecanismos: o hidrofóbico e o iônico, de modo a justificar a dificuldade de dessorção da BTL-2 em sílica funcionalizada com Octil, considerando que a adsorção iônica seria um mecanismo que poderia aumentar a interação enzima-superfície. A agarose Octil possui superfície neutra conforme descrito em 2.5.5 que confere a esse suporte um processo de adsorção-dessorção de natureza hidrofóbica, não susceptível a interações eletrostáticas e sua elevada hidrofobicidade é compensada pela alta porosidade da partícula no processo de dessorção resultando em altos rendimentos de dessorção reportados em 4.3.2.

Desse modo a presença de cargas na superfície da sílica pode desfavorecer a interação hidrofóbica. Porém, sua existência pode favorecer a adsorção iônica de proteínas, dependendo da carga dos resíduos e assim do pH da adsorção. Vale destacar que em pH 3 a enzima está mais carregada positivamente. Estudos adicionais são necessários para explorar a influência das interações eletrostáticas em adsorção hidrofóbica utilizando matrizes de sílica.

Os mesmos ensaios realizados a uma razão de lavagem ( $\beta$ ) significativamente maior (1:200), apresentam a mesma tendência, e os rendimentos de dessorção obtidos são elevados, conforme esperado e demonstrado anteriormente no item 4.3.4 e sumarizado na Tabela 4.14.

Tabela 4-14. Variação da força iônica para a dessorção de lisozima em pH 3 e 7. Razão de dessorção (m/v) **1:200**; 25°C; 50 rpm; durante 16 horas. 1% de Triton X-100. Suporte PURUFICA-Y-C8.

	<b>pH 3</b>		<b>pH 7</b>	
Força Iônica	25 mM	200 mM	25 mM	200 mM
RDP	96,0±1,2	82,8±4,8	86,5±1	96,3±1,5

Fonte: Próprio autor (2019)

RDP: Rendimento de dessorção de proteínas.

Sob as mesmas condições, apenas com alteração do  $\beta$  de 10 para 200, obteve-se rendimentos significativamente maiores e próximos a 100%, conforme previsto pelo modelo descrito na Figura 4.16.

## 5 CONCLUSÕES

O trabalho propôs a utilização de isotermas de dessorção que permitiram avaliar a intensidade da interação enzima-suporte de modo a classificar diferentes materiais quanto ao seu grau de hidrofobicidade, propiciando maior entendimento das interações enzimáticas com a superfície.

Os resultados demonstraram a importância da adequada hidratação de adsorventes secos para posterior utilização. É recomendável avaliar a molhabilidade dos materiais antes de iniciar as atividades, principalmente no caso de grupos de ativação hidrofóbicos.

A Octil-agarose possui maiores rendimentos de dessorção do que sílicas funcionalizadas utilizadas, sendo um material mais apropriado para obter concentração da proteína na etapa de dessorção. Ainda assim, resultados com isotermas na presença de detergente indicaram que a interação enzima-adsorvente é maior para a Octil-agarose. Isto foi confirmado pelos resultados de seletividade a partir da adsorção de extrato com BTL-2 e justificado pelo número de grupos por massa de sólido. Assim, a matriz Octil-agarose apresentou maior hidrofobicidade do que os adsorventes com base em sílica.

O maior rendimento associado a uma maior interação enzima-superfície pôde ser justificado pela elevada porosidade da partícula de Octil-agarose e ausência de interações iônicas devido à neutralidade desse suporte. A explicação complementa às sugestões anteriores (Lopes, 2016), que justificavam o menor rendimento de dessorção a partir dos materiais hidrofóbicos baseados em sílica somente através da interação enzima-suporte. A hipótese anterior era fundamentada na ideia de que a presença de grupos carregados negativamente na superfície da sílica poderia desfavorecer a interação hidrofóbica, mas favorecer a atração eletrostática, o que tornaria a interação enzima-sílica funcionalizada maior.

Os adsorventes de sílica funcionalizada com C1 e C8 apresentam hidrofobicidade similar e rendimento de dessorção similar, sendo que as isotermas na presença de detergente para a sílica-C8 indicaram uma interação pouco maior entre enzima-adsorvente. Os resultados próximos são justificados pela densidade de grupos para cada um dos materiais.

A estratégia de aumentar a temperatura do processo de dessorção não

aumentou significativamente o rendimento de dessorção em sílica-C8. Assim, as discussões traçadas neste trabalho são de relevância tecnológica, pois indicam caminhos que podem ser tomados para aumentar o processo de concentração a partir da dessorção de materiais de sílica funcionalizada, em que podem atuar:

- Maior porosidade de partícula;
- Trabalhar com grupos menos hidrofóbicos;
- Heterofuncionalização;
- Eliminação dos grupos carregados existentes em matriz de sílica que são resultantes do processo de síntese desse material.

Como mesmo o material com C1 não obteve resultados melhores de dessorção, torna-se necessário utilizar grupos distintos, que sejam ainda menos hidrofóbicos. Essa última hipótese pôde ser confirmada com os ensaios preliminares do suporte ativado com grupos DIOL, em que se obteve significativo rendimento de dessorção de proteínas, apesar do número limitado de ensaios realizados. Assim o trabalho certamente contribui para a continuidade do desenvolvimento de materiais hidrofóbicos para cromatografia de macromoléculas altamente hidrofóbicas em conjunto à concentração de proteínas em solução.

## 6 Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar o papel dos efeitos conjuntos de interação iônica e hidrofóbica em suportes de sílica.
- Avaliações mais detalhadas do grupo diol e outras alternativas pouco hidrofóbicas de grupo.
- Utilizar outras lipases de pureza considerável e de tamanho de tampa distinto e a BTL-2 previamente purificada, de modo a distinguir melhor os efeitos das características da tampa no processo adsorptivo.
- Utilizar partículas de sílica de poro e porosidade de partícula controlados, de modo a validar as hipóteses levantadas e verificar o papel dos poros na elutriação e adsorção das macromoléculas.
- Procurar melhores definições para concentrações de Triton-X-100 de modo a selecionar a concentração de detergente que seja eficiente na dessorção, mas facilite processo posterior de purificação.
- Ensaios em coluna seriam importantes para avaliar os materiais nesse tipo de sistema.



## 7 Referências Bibliográficas

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013.
- AMGARTEN, D. R. Determinação do volume específico de poros de sílicas cromatográficas por dessorção de líquidos em excesso. **Dissertação de mestrado**, p. 80, 2006.
- BASTIDA, A. *et al.* A Single Step Purification , Immobilization , and Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports. 1998.
- BHATTACHARYYA, M. S. *et al.* Lysozyme adsorption and release from ordered mesoporous materials. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 47, p. 19928–19934, 2010.
- CARRASCO-LÓPEZ, C. *et al.* Activation of bacterial thermo alkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, p. 4365–4372, 2009.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G. *et al.* Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 773–779, 2005.
- GHOSH, R.; SILVA, S. S.; CUI, Z. Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 1, p. 19–24, 2000.
- GUIOCHON, G.; FELINGER, A.; SHIRAZI, D. G.; KATTI, A. M. Fundamentals of preparative and nonlinear Chromatography. San Diego: Elsevier, 2006.
- JESIONOWSKI, T. *et al.* Enzyme immobilization by adsorption: a review. [s.d.].
- KATIYAR, A. *et al.* Adsorption of Bovine Serum Albumin and lysozyme on siliceous MCM-41. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 80, n. 1–3, p. 311–320, 2005.
- LEE, J. W. *et al.* Adsorption equilibrium of amino acids and antibiotics on non-ionic polymeric sorbents Gas constant. v. 420, n. December 2003, p. 413–420, 2004.
- LENINGHER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p.233.
- LIMA, L. N. DE *et al.* Mono- and heterofunctionalized silica magnetic microparticles (SMMPs) as new carriers for immobilization of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. S491–S499, 2016.
- MENDES, A. A. Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para

a síntese enzimática de biodiesel. **Departamento de Engenharia Química**, p. 225 p., 2009.

MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

MOLLERUP, J. M. A review of the thermodynamics of protein association to ligands, protein adsorption, and adsorption isotherms. **Chemical Engineering and Technology**, v. 31, n. 6, p. 864–874, 2008.

PALOMO, J. M. *et al.* Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl–Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 1920, p. 279–286, 2002.

PALOMO, JOSE M. *et al.* Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1–2, p. 267–273, 2004.

PALOMO, J. M. *et al.* Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 2, p. 630–635, 2004.

PALOMO, M. *et al.* Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of ( ± ) -  $\alpha$ -hydroxy-phenylacetic acid derivatives. v. 13, p. 1337–1345, 2002.

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

RICHARD R BURGESS, MURRAY P. DEUTSCHER (2009). 463: Guide to Protein Purification, Volume 436, Second Edition (Methods in Enzymology) 2nd Edition, 912 pp.

RU, M. L. *et al.* Large-scale production , purification and properties : aggregation behaviour and its effect on activity. v. 56, p. 89–102, 1997.

RUTHVEN, D. M. Principles of Adsorption and Adsorption Processes, 1º Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1984

SABEL, S. C. Universidade Federal De Santa Catarina Centro De Filosofia E Ciências Humanas Programa De Pós-Graduação Em Psicologia. p. 6–8, 2006.

SABUQUILLO, P. *et al.* “Interfacial affinity chromatography” of lipases: Separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic

groups. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1388, n. 2, p. 337–348, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Live - Wednesday football. **Bbc**, v. 19, p. 627–662, 2011.

SHELDON, R. A.; PELT, S. VAN. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SUWAL, S.; DOYEN, A.; BAZINET, L. Characterization of protein, peptide and amino acid fouling on ion-exchange and filtration membranes: Review of current and recently developed methods. **Journal of Membrane Science**, v. 496, p. 267–283, 2015.

WILSON, K.; WALKER, J. Técnicas eletroforéticas. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed**, p. 399, 2010.

ZHAO, D.; PENG, C.; ZHOU, J. Lipase adsorption on different nanomaterials: a multi-scale simulation study Lipase adsorption on different nanomaterials: a multi-scale simulation study. **Phys. Chem. Chem. Phys. Phys. Chem. Chem. Phys**, v. 17, n. 17, p. 689–1504, 2015.

ZHURAVLEV, L. T. 16. The surface chemistry of amorphous silica. v. 173, p. 1–38, 2000.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14139–14194, 2014.