

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**

**SELEÇÃO DE SUPORTES E PROTOCOLOS DE
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES PARA A SÍNTESE
ENZIMÁTICA DE BIODIESEL**

Adriano Aguiar Mendes

SÃO CARLOS
2009

**SELEÇÃO DE SUPORTES E PROTOCOLOS DE
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES PARA A SÍNTESE
ENZIMÁTICA DE BIODIESEL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**

**SELEÇÃO DE SUPORTES E PROTOCOLOS DE
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES PARA A SÍNTESE
ENZIMÁTICA DE BIODIESEL**

Adriano Aguiar Mendes

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientadoras: Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano e Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

**SÃO CARLOS
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M538ss

Mendes, Adriano Aguiar.

Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel / Adriano Aguiar Mendes. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
194 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Tecnologia de enzimas. 2. Imobilização. 3. Lipase. 4. Transesterificação. 5. Biodiesel. I. Título.

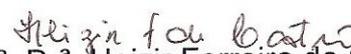
CDD: 660.634 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ADRIANO AGUIAR MENDES**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 25 DE MAIO DE 2009.

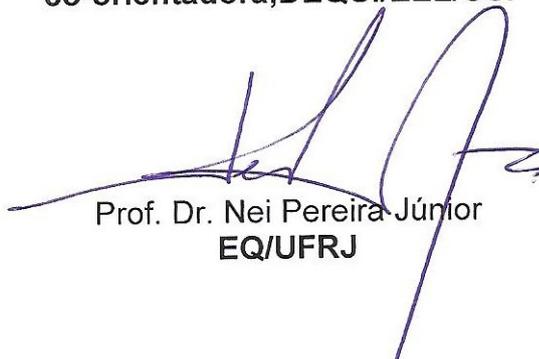
BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Raquel de Lima Camargo Giordano
orientadora, PPG-EQ/UFSCar



Prof^a. Dr^a. Heizer Ferreira de Castro
co-orientadora, DEQUI/EEL/USP



Prof. Dr. Nei Pereira Júnior
EQ/FRJ



Prof^a. Dr^a. Gisella Maria Zanin
DEQ/UEM



Dr^a. Lídia Maria Melo Santa Anna
PETROBRÁS



Prof. Paulo Waldir Tardioli
DEQ/UFSCar

Dedico esta tese de doutorado à minha mãe Maura e aos meus irmãos André, Jaqueline e Aldo Henrique que sempre me deram apoio, carinho, dedicação, incentivo durante todos estes anos. Vocês são a razão desta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que ele representa em minha vida.

À minha mãe Maura por ter me incentivado sempre a estudar, pelo apoio financeiro e moral, carinho, incentivo e AMOR. Obrigado por tudo que você fez por nós, pois sempre lutou e nunca mediu esforços em nos ajudar.

Aos meus irmãos Aldo Henrique, Jaqueline e André pelo apoio, carinho, incentivo e palavras de conforto. Sem vocês, minha vida não teria sentido. Quero agradecer em especial ao meu irmão, Dr. André Aguiar Mendes, meu principal companheiro de vida acadêmica.

Às minhas orientadoras Profa. Raquel de Lima Camargo Giordano e Profa. Heizir Ferreira de Castro pelo incentivo, apoio, carinho, confiança, amizade e pela competência em orientar este trabalho. Quero agradecer a Profa. Heizir pelo voto de confiança em mim depositado por continuar a trabalhar com as lipases e por ter me acompanhado desde 2001 na minha carreira acadêmica. Agradeço também aos professores Roberto Giordano, Tereza Zangirolami e Paulo Tardioli pelo apoio e ótima convivência durante o meu doutorado.

Ao Dr. José Manuel Guisán e Dr. Roberto Fernández-Lafuente do Instituto de Catálisis y Petroleoquímica – ICP/CSIC pelas valiosas contribuições a este trabalho, pela orientação no estágio realizado em Madrid e pelo carinho, amizade e excelente convivência.

Aos doutores José M. Palomo e Dra. Glória Fernández-Lorente pelas valiosas contribuições, ensinamentos e amizade e ao Dr. Benevides Pessela (Beni) e a Maricarmem pelo apoio, carinho, amizade e a simpatia.

Ao casal Raquel e Francisco e toda família Monti pela amizade e apoio, me proporcionando momentos muito alegres. Vocês são sinônimo de luta e superação.

Aos meus amigos do Departamento de Engenharia Química da UFSCar – Dasciana, Geísa, Karolliny, Wellington, Rafael, Aline, Danielle, Cássia, Juliana Teodoro, Carolina (Lora), Tiago Martins, Andréia, André (morcegão), Adilson, Edson, Any, Juliana, Sandra, Willian e a Mônica Iemma e Fabiana Batigalhia pela excelente convivência, amizade, festas e churrascos e companheirismo. Quero agradecer em especial à Danielle Vieira Reis, pela linda amizade que construímos durante estes dois últimos anos e que perdurará para sempre, minha grande

amiga e companheira. Agradeço também em especial aos amigos Wellington e Dasciana pelas discussões pertinentes ao meu trabalho, amizade e companheirismo durante estes quatro anos. Aos meus amigos do Laboratório de Biocatálise da EEL-USP – Ariela, Patrícia, Guilherme, Gisele, Larissa, Grazielle, Raquel, Mateus, André, Renato, Felipe e a Ana Paula pela amizade, ótima convivência e apoio durante os meses de estágio em Lorena. Aos meus amigos do Departamento de Biotecnologia da EEL-USP pela amizade e excelente convivência, em especial a Jussara e a Larissa Canilha.

Aos amigos Ernandes, Cleide, Michele, Kátia Rocha, Andréia, amigos de longa data. Agradeço em especial, à Andréia por ter me acolhido em sua casa durante o último estágio em Lorena e pelo carinho, afeto e pela linda amizade que construímos. Em um dos momentos mais tristes de minha vida você e a sua família me estenderam a mão. Agradeço também à Elaine Braga (Minhoca) pela ajuda e amizade.

Aos meus amigos de São Carlos – Maria Carolina, Naiene, Gustavo (Barba), Juliana Donadone, Camila, Felipe (Pipo), Ana Flora, Simone de Lima, Paulo Tardioli, Flávia, Emilie, Breno, Eliana (Lili), Carmen, Helô, Alia, Lucimara (Fóta) e às famílias Toledo de Pierri (Karen, Vivian, Júlia e Douglas) e Rodrigues Tognetti (Érica, Zé, Bruno, Marilza e Beto) pela amizade, confiança e companheirismo. Vocês fizeram meus dias mais alegres aqui em São Carlos. Todos vocês são muito especiais para mim. Quero agradecer em especial à Maria Carolina, a pessoa mais importante para mim em São Carlos pela convivência, quase quatro anos morando juntos, e à forte amizade que construímos durante este período.

Aos amigos do Bar Pimenta – Alan, Marcelo (Gigante), Maurício, Thiago, Luiz e Jairo pela amizade, excelente companhia e por servir o melhor chopp de São Carlos.

Aos amigos Juanma, Palomo, Fernando, Javier, Zaida, Beni, Pilar, César Godoy e César Mateo pelo carinho, amizade e as excelentes recreações durante o estágio em Madrid. Quero agradecer ao Horácio Falcón pela amizade e por me acolher em Madrid.

Às secretárias Alcione, Kátia, Evelyn, Josiane, Thaisa e Cláudia pela simpatia e presteza.

À Rosana, Lena, Eva, Maísa, Silvana, Ivânia e Lu pela simpatia, carinho e amizade.

À Novozymes S.A. pela doação das lipases CALB, Lipex[®] 100L e LTL empregadas no presente trabalho.

À FAPESP pelo suporte financeiro e à CAPES pela concessão da bolsa durante o estágio na Espanha.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo preparar e selecionar derivados imobilizados de lipases com elevada atividade catalítica e estável termicamente para mediar a síntese de biodiesel a partir dos óleos de palma e babaçu pela rota etílica. O trabalho experimental foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira etapa, diferentes fontes de lipases incluindo as lipases de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Candida antarctica* tipo B (CALB), pâncreas de porco (LPP), *Bacillus thermocatenuatus* (BTL2), *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e Lipex[®] 100L foram imobilizadas em diferentes suportes ativadas por diferentes protocolos usando dois procedimentos de imobilização, adsorção física e ligação covalente multipontual. As seguintes matrizes foram testadas: agarose, Toyopearl, complexos polieletrólíticos de quitosana, octil-agarose, hexil-toyopearl e PHB e os agentes de ativação testados foram: glutaraldeído, epícloridrina e glicidol. Como esperado o procedimento de imobilização, suporte e fonte de lipase afetaram as propriedades catalíticas dos derivados imobilizados e adequação para mediar a síntese proposta. Com exceção da LPP, todas as preparações de lipase (LTL, PFL, Lipex[®] 100L e CALB) mostraram elevada estabilidade em meio alcalino (72 h em pH 10,05) e resultaram em derivados com elevada atividade hidrolítica. As atividades hidrolíticas mais elevadas foram obtidas pela LTL imobilizada em glioxil-agarose, glioxil-quitosana-alginato-TNBS, epóxi-quitosana-alginato e Lipex[®] 100L imobilizada em epóxi-quitosana-alginato e em glioxil-agarose. Na síntese de butirato de butila, as reações catalisadas por LTL e LPF imobilizadas em glioxil-agarose e glioxil-amino-toyopearl apresentaram conversões superiores a 65%. As estabilidades térmicas mais elevadas foram obtidas para BTL2 não-aminada imobilizada em glioxil-agarose 10BCL (FE=2648) e aminada

quimicamente (FE=4360), seguido de CALB aminada imobilizada em glioxil-agarose 6BCL (FE=290) e LTL imobilizada em glioxil-agarose 6BCL (FE~300). Usando quitosana-alginato, as estabilidades térmicas mais elevadas foram obtidas para LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativados com grupos glioxil e glutaraldeído (FE=45). A imobilização de lipases BTL2, CALB e LTL em suportes hidrofóbicos octil-agarose e hexil-toyopearl por adsorção física resultaram em derivados estáveis termicamente com elevada atividade catalítica em reações de hidrólise. Lipases também foram imobilizadas em poli(hidróxibutirato) (PHB) por adsorção física e os derivados preparados apresentaram alta atividade catalítica em meio aquoso e orgânico. Tomando por base as propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico, bem como a estabilidade térmica foram selecionados para mediar a síntese de biodiesel os derivados de LTL e LPF imobilizados em géis glioxil-agarose e glioxil-amino-toyopearl e LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS por ativação com glicidol, derivados preparados das lipases LTL, LPF, Lipex[®] 100L e CALB em PHB. Para as lipases imobilizadas por ligação covalente multipontual e nas condições testadas, a conversão total em ésteres de etila foi alcançada entre 24 a 48 h, dependendo do óleo vegetal. Para os derivados preparados por adsorção física em PHB, um maior tempo de reação (72 h) foi necessário para atingir a conversão total em ésteres de etila. Apesar da elevada atividade de esterificação, BTL2 imobilizada em PHB não catalisou a reação de etanolise de ambos os óleos vegetais, mas mostrou alta atividade de esterificação. Os valores de viscosidade das amostras de biodiesel purificadas (3.4-4.5 cSt) atendem as especificações recomendadas pela Agência Brasileira de Petróleo (ANP) para ser usado como biocombustível.

Palavras-chave: Suportes, imobilização, lipases, transesterificação, biodiesel.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to prepare and select immobilized lipase derivatives with high catalytic activity and thermal stability to mediate the biodiesel synthesis from palm and babassu oils by ethanolic route. The experimental work was carried out in two steps. In the first, different lipases sources, including lipases from *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Candida antarctica* type B (CALB), porcine pancreas (PPL), *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2), *Pseudomonas fluorescens* (LPF) and Lipex[®] 100L were immobilized on different supports activated by several protocols using two immobilization methods, such as physical adsorption and multipoint covalent attachment. The following matrixes were used: agarose, Toyopearl, chitosan, alginate-chitosan, octyl-agarose, hexyl-toyopearl and PHB and activating agents were: glutaraldehyde, epichlorohydrin and glycidol. As expected the immobilization procedure, support and lipase source affected the catalytic properties of the immobilized derivatives and their suitability for the proposed reaction. With an exception of PPL, all lipase preparations (TLL, PFL, Lipex[®] 100L and CALB) showed high alkaline stability under the immobilization conditions (72 h at pH 10.05) resulting in immobilized derivatives having high hydrolytic activities. The highest hydrolytic activities were obtained by TLL immobilized on glyoxyl-agarose, glyoxyl-chitosan-alginate-TNBS, epoxy-chitosan-alginate and Lipex[®] 100L immobilized on epoxy-chitosan-alginate and glyoxyl-agarose. Under non-aqueous media using butyl butyrate synthesis as a model system, TLL and PFL immobilized on glyoxyl-agarose and glyoxyl-amine-toyopearl showed similar conversions. The highest thermal stability were obtained for non-aminated BTL2 immobilized on glyoxyl-agarose 10BCL (Stability Factor- SF =2648) and chemically aminated (SF=4360),

followed by aminated CALB immobilized on glyoxyl-agarose BCL (SF=290) and TLL immobilized on glyoxyl-agarose BCL (SF~300). Using chitosan-alginate, the highest thermal stability was obtained for TLL immobilized on chitosan-alginate-TNBS activated with glyoxyl groups and glutaraldehyde (SF=45). The immobilization of lipases BTL2, CALB and TLL on hydrophobic supports such as octyl-agarose and hexyl-toyopearl by physical adsorption allowed obtaining thermal stable derivatives. In addition, immobilized derivatives on poly-(hydroxybutyrate) (PHB) showed high catalytic activity in both hydrolysis and esterification reactions. In the second step and based on their catalytic properties under both aqueous and non-aqueous media as well as thermal stabilities the following immobilized derivatives: TLL and PFL immobilized on glyoxyl-agarose and glyoxyl-amine-Toyopearl, TLL immobilized on chitosan-alginate-TNBS activated with glyoxyl and glutaraldehyde; TLL, PFL, Lipex[®] 100L and CALB immobilized by physical adsorption on PHB were selected to mediate the synthesis of biodiesel from palm and babassu oils. For derivatives prepared by multipoint covalent attachment and under the conditions used, total conversion in ethyl esters was achieved within 24 to 48 h, depending on the vegetable oil. For immobilized derivatives prepared by physical adsorption on PHB, a slight higher reaction time (72 h) was needed to attain total conversion in ethyl esters. Despite its high esterification activity, BTL2 immobilized on PHB failed to mediate the ethanolysis of both vegetable oils. The viscosity values for the biodiesel samples (3.4-4.5 cSt) are in accordance with specifications recommended by the Brazilian Petroleum Agency (ANP) to be used as biofuel.

Keywords: Supports, lipases immobilization, thermal stabilization, transesterification, biodiesel.

LISTA DE FIGURA

FIGURA 2.1.	Reações catalisadas pelas lipases.....	9
FIGURA 2.2.	Mecanismo da influência de tensoativos sobre a atividade catalítica de lipases.....	12
FIGURA 2.3.	Estrutura química da resina acrílica Toyopearl AF-Amino-650M.....	16
FIGURA 2.4.	Estrutura dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose.....	19
FIGURA 2.5.	Influência do pH sobre a estrutura do hidrogel.....	23
FIGURA 2.6.	Estrutura química de quitosana reticulada com glutaraldeído (A) e epícloridrina (B).....	26
FIGURA 2.7.	Imobilização de lipases por adsorção física em suportes hidrofóbicos.....	30
FIGURA 2.8.	Esquema representativo de imobilização de enzimas em suportes glioxil.....	31
FIGURA 2.9.	Mecanismo de aminação dos grupos carboxílicos da lipase ativados com EDAC na presença de EDA.....	35
FIGURA 2.10.	Esquema representativo de imobilização de enzimas em suportes epóxi.....	36
FIGURA 2.11.	Equação geral de transesterificação de óleos e gorduras com alcoóis de cadeia curta na síntese de biodiesel.....	41
FIGURA 2.12.	Produção de biodiesel por transesterificação alcalina (A) e enzimática (B) de óleos e gorduras.....	45
FIGURA 3.1.	Esquema representativo de preparação dos polieletrólitos de quitosana.....	57

FIGURA 3.2.	Mecanismo de reação entre TNBS e os grupos amino de hidrogéis de quitosana.....	58
FIGURA 3.3.	Esquema representativo do processo de aminação química de enzimas em fase sólida por EDA na presença de EDAC.....	67
FIGURA 4.1.	Estabilidade alcalina da lipase LPP em tampão bicarbonato pH 10,05 (□) e em tampão borato (■).....	81
FIGURA 4.2.	Desaparecimento de atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização das lipases LTL (A), LPF (B), Lipex [®] 100L (C) e CALB (D) empregando como suporte gel de agarose ativado por glicidol (■), epícloridrina (□) e glutaraldeído (●) em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,05 na presença de 0,15% de Triton X-100 a 25 °C. Carga de proteína oferecida de 5 mg.g ⁻¹ de gel e a atividade da solução enzimática nas condições de imobilização (solução controle (○)).....	84
FIGURA 4.3.	Perfil de inativação térmica de LTL imobilizada em gel glioxil-agarose ativado por glicidol (A), epícloridrina (B) e glutaraldeído (C) a 70 °C em tampão fosfato pH 8,0 100 mM..	90
FIGURA 4.4.	Desaparecimento de atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de lipase CALB em gel glioxil sepabeads sem aminação química (A) e aminada quimicamente (B) e em gel glioxil agarose sem aminação química (C) e aminada quimicamente (D) na presença de 1% de Triton X-100. A imobilização foi realizada por 24 h em tampão bicarbonato 50 mM pH 10,05 a 25 °C. Atividade da suspensão (■) e do sobrenadante (●).....	101
FIGURA 4.5.	Desaparecimento de atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de lipase BTL2 em gel glioxil-agarose sem aminação química (A) e aminada quimicamente (B) na presença de 1% de Triton X-100. A imobilização foi realizada por 24 h em tampão bicarbonato 50 mM pH 10,05 a 25 °C. Atividade da suspensão (■) e do sobrenadante (●).....	103
FIGURA 4.6.	Estabilidade térmica de CALB (A) e BTL2 (B) solúveis (■) e imobilizadas em glioxil-sepabeads na forma aminada (Δ) e não aminada (▲) e em glioxil-agarose na forma aminada (○) e não aminada (●).....	106

FIGURA 4.7.	Estabilidade em dioxano (A) e etanol (B) dos derivados de CALB aminada (●) e não-aminada (○) e de BTL2 aminada (■) e não-aminada (□) imobilizada em glioxil-agarose.....	108
FIGURA 4.8.	Desaparecimento de atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de lipase LTL imobilizada em gel quitosana-alginato-TNBS ativado por glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●) em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,05 na presença de 0,15% de Triton X-100 a 25 °C. Carga de proteína oferecida de 5 mg.g ⁻¹ de gel e a atividade enzimática nas condições de imobilização do controle (○).....	113
FIGURA 4.9.	Estabilidade térmica da lipase LTL solúvel (○) e imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativado com glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●). A inativação térmica foi realizada a 70 °C em tampão fosfato 100 mM pH 8,0.....	115
FIGURA 4.10.	Cinética de adsorção do corante hidrofóbico Rosa de Bengala em hidrogéis híbridos de quitosana-alginato (■) e quitosana-alginato-TNBS (□).....	116
FIGURA 4.11.	Porcentagem de reticulação de hidrogéis de quitosana-alginato-TNBS e ativados por diferentes protocolos.....	118
FIGURA 4.12.	Influência da temperatura na atividade hidrolítica de LTL solúvel (○) e imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativada com glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●)..	126
FIGURA 4.13.	Influência da temperatura na atividade hidrolítica de LTL solúvel (○) e imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativada com glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●)..	127
FIGURA 4.14.	Inativação térmica das enzimas solúveis (○) e dos derivados preparados de LTL (A) e LPF (B) imobilizados em glioxil-toyopearl ativados por glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●) incubados a 70 °C na presença de tampão fosfato pH 8,0 100 mM.....	133
FIGURA 4.15.	Estabilidade térmica de derivados de LTL imobilizados em suporte epóxi-(A) e tiol-epóxi-(B) por 12 (○), 24 (▲), 48 (●) e 72 h (□) e da lipase solúvel (■).....	136

FIGURA 4.16.	Estabilidade térmica das lipases (▲) solúveis e dos (■) derivados de Lipex [®] 100L (A) e de LPF (B) imobilizados por 24 h em suporte epóxi-quitosana-alginato.....	143
FIGURA 4.17.	Cinética de imobilização de lipase LTL por adsorção física em suportes hidrofóbicos (A) octadecil-sepabeads, (B) hexil-toyopearl e (C) octil-agarose. (■) atividade hidrolítica do controle, (▲) suspensão e (●) sobrenadante. Imobilizações realizadas em tampão fosfato pH 7,0 5 mM a 25 °C com carregamento de proteína de 1 mg.g ⁻¹ de gel).....	145
FIGURA 4.18.	Cinética de imobilização de lipase CALB por adsorção física em suportes hidrofóbicos (A) octadecil-sepabeads, (B) hexil-toyopearl e (C) octil-agarose. (■) atividade hidrolítica do branco, (▲) suspensão e (●) sobrenadante. Imobilizações realizadas em tampão fosfato pH 7,0 5 mM a 25 °C com carregamento de proteína de 1 mg.g ⁻¹ de gel).....	147
FIGURA 4.19.	Estabilidade térmica de CALB (A), LTL (B) e BTL2 (C) solúvel (■) e imobilizadas em octadecil-sepabeads (●), hexil-toyopearl (○) e octil-agarose (▲) a 70 °C.....	148
FIGURA 4.20.	Rendimento de transesterificação do óleo de palma em biodiesel (símbolos vazios) e redução da viscosidade (símbolos cheios) por etanólise do óleo de babaçu catalisada por LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativada por glicidol (quadrado), epiclorigrina (triângulo) e glutaraldeído (círculo).....	167
FIGURA 4.21.	Rendimento de transesterificação (quadrados) e redução da viscosidade (círculos) por etanólise do óleo de babaçu catalisada por lipases (A) CALB, (B) LPF, (C) Lipex [®] 100L e (D) LTL imobilizadas por adsorção hidrofóbica em PHB em pó (cheio) e granular (vazio).....	168
FIGURA 4.22.	Síntese de ésteres catalisadas por BTL2 imobilizada em PHB em pó.....	171

LISTA DE TABELA

TABELA 2.1.	Mercado mundial de enzimas e aplicação (milhões de dólares).....	5
TABELA 2.2.	Concentração de proteína imobilizada em diferentes resinas acrílicas comercializadas pela empresa Tosoh Bioscience.....	16
TABELA 2.3.	Atividade recuperada e fator de estabilidade para diversas enzimas imobilizadas multipontualmente em glioxil-agarose...	32
TABELA 2.4.	Parâmetros de imobilização de enzimas em Sepabeads monofuncional (epóxi) e heterofuncional (epóxi-amino).....	37
TABELA 2.5.	Exemplos de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos e gorduras.....	48
TABELA 3.1.	Principais características das preparações de lipases empregadas.....	51
TABELA 3.2.	Propriedades dos óleos de palma e babaçu.....	53
TABELA 3.3.	Composição em ácidos graxos e massa molecular dos óleos de palma e babaçu.....	53
TABELA 3.4.	Condições de preparação dos derivados de LTL, LPF, Lipex [®] 100L, LPP, BTL2 e CALB imobilizados por diferentes protocolos.....	70
TABELA 3.5.	Condições para determinação dos mono-ésteres de etila produzidos.....	77
TABELA 4.1.	Influência do tempo de imobilização sobre as propriedades catalíticas de CALB, LTL, LPF e Lipex [®] 100L imobilizadas em gel de agarose 6BCL ativada por diferentes protocolos. Carga oferecida de 5 mg de proteína.g ⁻¹ de gel. Atividade oferecida: LTL (1256 U.g ⁻¹ de gel); LPF (1087,5 U.g ⁻¹ de gel); CALB (398,0 U.g ⁻¹ de gel); Lipex [®] 100L (1592,5 U.g ⁻¹ de gel).....	86

TABELA 4.2.	Parâmetros de imobilização da LTL em agarose ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.....	93
TABELA 4.3.	Parâmetros de imobilização da LPF em agarose ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.....	93
TABELA 4.4.	Parâmetros de imobilização da Lipex [®] 100L em agarose ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.....	95
TABELA 4.5.	Parâmetros de imobilização da CALB em agarose ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.....	96
TABELA 4.6.	Síntese de butirato de butila catalisada por LTL e LPF imobilizadas em agarose 6 BCL ativada por diferentes protocolos.....	98
TABELA 4.7.	Parâmetros de imobilização de CALB e BTL2 imobilizadas em glioxil-agarose e glioxil-sepabeads.....	104
TABELA 4.8.	Influência do tipo de CPE e da modificação química com TNBS sobre os parâmetros de imobilização da lipase LTL imobilizada em hidrogéis híbridos de quitosana. Carregamento oferecido de 5 mg proteína.g ⁻¹ de gel (956 U. g ⁻¹ de gel).....	110
TABELA 4.9.	Adsorção de corante hidrofóbico Rosa de Bengala e porcentagem de hidratação (PH) de quitosana-alginato não modificado e modificado quimicamente com TNBS.....	117
TABELA 4.10.	Influência do tempo de imobilização e da redução com borohidreto de sódio sobre os parâmetros de imobilização de LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativado por diferentes protocolos. Carga enzimática oferecida de 5 mg proteína.g ⁻¹ de gel (956 U. g ⁻¹ de gel).....	121
TABELA 4.11.	Influência da concentração de laurinaldeído sobre os parâmetros de imobilização da lipase LTL imobilizada em quitosana-alginato ativado com glicidol. Carga enzimática oferecida de 5 mg de proteína.g ⁻¹ gel (956 U. g ⁻¹ de gel).....	123

TABELA 4.12.	Parâmetros de imobilização obtidos para diferentes cargas de proteína oferecida para quitosana-alginato-TNBS ativada por diferentes protocolos. Atividade enzimática de LTL de 191,2 U.mg ⁻¹ de proteína.....	124
TABELA 4.13.	Síntese de butirato de butila catalisada por LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativada por diferentes protocolos.....	128
TABELA 4.14.	Imobilização de lipase microbiana LTL em PHB ativado por diferentes protocolos. Carga enzimática oferecida de 5 mg proteína.g ⁻¹ de suporte (atividade oferecida = 956 U.g ⁻¹ de suporte).....	128
TABELA 4.15.	Imobilização de LTL em bagaço de cana ativado por diferentes protocolos. Carga enzimática oferecida de 5 mg proteína.g ⁻¹ de suporte (atividade oferecida = 956 U.g ⁻¹ de suporte).....	130
TABELA 4.16.	Parâmetros de imobilização da LTL e LPF em toyopearl ativado por diferentes protocolos. Carga oferecida de 5 mg de proteína.g ⁻¹ de gel. Atividade oferecida: LTL (956 U.g ⁻¹ de gel) e LPF (1087,5 U.g ⁻¹ de gel).....	131
TABELA 4.17.	Parâmetros de imobilização da LTL em amino-toyopearl ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.....	133
TABELA 4.18.	Síntese de butirato de butila catalisada por LTL e LPF imobilizadas em amino-toyopearl ativada por diferentes protocolos.....	134
TABELA 4.19.	Parâmetros de imobilização da lipase LTL em hidrogel epóxi-quitosana-alginato. Carga oferecida de 5 mg de proteína.g ⁻¹ de gel. Atividade hidrolítica oferecida de 956 U.g ⁻¹ de gel.....	138
TABELA 4.20.	Parâmetros de imobilização da lipase LTL em hidrogel epóxi-itiol-quitosana-alginato. Atividade hidrolítica oferecida de 956 U.g ⁻¹ de gel.....	138
TABELA 4.21.	Parâmetros de imobilização da lipase LTL em hidrogel epóxi-quitosana-alginato. Atividade hidrolítica oferecida de 191,2 U.mg ⁻¹ de proteína.....	139

TABELA 4.22.	Parâmetros de imobilização da lipase LTL em hidrogel epóxi- tiol-quitosana-alginato. Atividade hidrolítica de 191,2 U.mg ⁻¹ de proteína.....	140
TABELA 4.23.	Parâmetros de imobilização da lipase LPF em hidrogel epóxi- quitosana-alginato. Atividade hidrolítica de 217,5 U.mg ⁻¹ de proteína.....	141
TABELA 4.24.	Parâmetros de imobilização da lipase Lipex [®] 100L em hidrogel epóxi-quitosana-alginato. Atividade hidrolítica de 175,6 U.mg ⁻¹ de proteína.....	142
TABELA 4.25.	Estimativa do tempo de meia-vida (t _{1/2}) e fator de estabilidade (FE) de lipases nas formas solúvel e imobilizadas em suportes hidrofóbicos.....	149
TABELA 4.26.	Parâmetros de imobilização de lipases de diferentes fontes em PHB em pó e granular.....	151
TABELA 4.27.	Síntese de butirato de butila catalisada por lipases imobilizadas por adsorção física em PHB em pó e granular.....	153
TABELA 4.28.	Rendimento de transesterificação de óleo de palma e etanol por lipases microbianas de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL) e <i>Pseudomonas fluorescens</i> (LPF) imobilizadas covalentemente em géis glioxil-agarose e glioxil-toyopearl ativados por diferentes protocolos.....	164
TABELA 4.29.	Rendimento de transesterificação de óleo de babaçu e etanol por lipases microbianas de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL) e <i>Pseudomonas fluorescens</i> (LPF) imobilizadas covalentemente em géis glioxil-agarose e glioxil-toyopearl ativados por diferentes protocolos.....	165
TABELA 4.30.	Proteína imobilizada oferecida na etanólise do óleo de babaçu e produtividade.....	170

LISTA DE ABREVIATURA

LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i>
LPP	Lipase de pâncreas de porco
BTL2	Lipase de <i>Bacillus thermocatenulatus</i>
LPF	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PVA	Álcool poli-vinílico
TNBS	Ácido 2,4,6 trinitro-benzenossulfônico
LAU	Laurinaldeído
GLI	Glicidol
EPI	Epicloridrina
GLU	Glutaraldeído
EDA	Etilenodiamina
EDAC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodi-imida
DTT	Ditiotreitol
BSA	Albumina sérica bovina
PHB	Poli-(hidróxibutirato)
<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -nitrofenilbutirato
AH _{der}	Atividade hidrolítica do derivado
PI	Proteína imobilizada
AR	Atividade recuperada
RI	Rendimento de imobilização
t _{1/2}	Tempo de meia-vida
FE	Fator de estabilidade
ANP	Agência Nacional do Petróleo

SUMÁRIO

		p
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	Enzimas como Biocatalisadores e suas Aplicações.....	4
2.2	Lipases.....	6
2.2.1	Fontes e Propriedades.....	7
2.2.2	Reações Catalisadas pelas Lipases.....	8
2.2.3	Mecanismo de Atuação.....	10
2.3	Imobilização de Enzimas: Suportes.....	13
2.3.1	Resina de Afinidade Toyopearl AF-Amino-650M.....	14
2.3.2	Poli-Hidróxibutirato (PHB).....	17
2.3.3	Bagaço de Cana-de-Açúcar.....	18
2.3.4	Quitosana.....	19
2.3.4.1	Princípio de Formação de Complexos Polieletrólíticos de Quitosana.....	22

2.3.4.2	Modificações Químicas na Estrutura da Quitosana.....	24
2.3.5	Agarose.....	28
2.4	Protocolos de Imobilização de Enzimas.....	29
2.4.1	Imobilização por Adsorção Física.....	29
2.4.2	Imobilização Covalente Multipontual de Enzimas em Geis Glioxil.....	31
2.4.2.1	Principais Fatores que Interferem na Imobilização Multipontual de Enzimas.....	32
2.4.3	Imobilização Multipontual de Enzimas em Suportes Epóxi.....	35
2.5	Biocatálise em Meios Não-Convencionais.....	38
2.6	Síntese de Biodiesel a partir de Óleos e Gorduras.....	40
2.6.1	Transesterificação de Óleos e Gorduras.....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1	Materiais.....	51
3.1.1	Enzimas.....	51
3.1.2	Suportes e Ativadores.....	52
3.1.3	Substratos.....	52

3.1.3.1	Atividade Hidrolítica e Síntese de Ésteres.....	52
3.1.3.2	Materiais de Partida para Síntese de Biodiesel.....	53
3.2	Metodologia Experimental.....	54
3.2.1	Determinação da Concentração de Proteína.....	54
3.2.2	Determinação das Atividades Hidrolíticas.....	54
3.2.2.1	Hidrólise do <i>p</i>-Nitrofenilbutirato.....	54
3.2.2.2	Hidrólise do Azeite de Oliva Emulsificado.....	54
3.2.3	Síntese de Ésteres Catalisada por Lipases.....	55
3.2.4	Estabilidade Térmica (Estimativa do tempo de meia-vida).....	56
3.2.5	Preparação de Polieletrólitos de Quitosana.....	56
3.2.5.1	Síntese dos Complexos Polieletrólíticos.....	56
3.2.5.2	Hidrofobização dos Polieletrólitos com TNBS.....	57
3.2.5.3	Hidrofobização do Complexo Polieletrólítico Quitosana-Alginato com Laurinaldeído.....	58
3.2.6	Protocolos de Ativação dos Suportes.....	58
3.2.6.1	Preparação do Gel Gliceril-Suporte Ativado com Glicidol.....	58

3.2.6.2	Preparação do Gel Gliceril-Suporte Ativado com Epicloridrina.....	59
3.2.6.3	Preparação dos Géis Glioxil-Suporte.....	59
3.2.6.4	Preparação do Gel Glioxil-Amino-Glutaraldeído.....	60
3.2.6.5	Ativação dos Polieletrólitos de Quitosana com Glutaraldeído.....	61
3.2.6.6	Oxidação do Hidrogel Quitosana-Alginato-TNBS com Periodato de Sódio.....	61
3.2.6.7	Preparação de Epóxi-Quitosana-Alginato.....	61
3.2.6.8	Preparação de Epóxi-Tiol-Quitosana-Alginato.....	62
3.2.6.9	Quantificação de Grupos Glioxil em Agarose.....	62
3.2.6.10	Quantificação de Grupos Epóxi.....	63
3.2.7	Caracterização Morfológica dos Polieletrólitos de Quitosana.....	63
3.2.7.1	Adsorção de Corante Hidrofóbico Rosa de Bengala.....	63
3.2.7.2	Estimativa da Porcentagem de Hidratação.....	64
3.2.7.3	Estimativa da Porcentagem de Reticulação no Complexo Polieletrólítico Quitosana-Alginato.....	64

3.2.8	Imobilização de Lipases por Diferentes Protocolos.....	65
3.2.8.1	Adsorção Física de Lipases em Suportes Hidrofóbicos Octil-Agarose, Hexil-Toyopearl e Octadecil-Sepabeads.....	65
3.2.8.2	Adsorção Física de Lipases em PHB.....	66
3.2.8.3	Aminação de Lipases Imobilizadas em Octil-Agarose.....	66
3.2.8.4	Protocolo de Imobilização Multipontual das Lipases Aminadas CALB e BTL2 em Glioxil-Agarose 10 BCL e Glioxil-Sepabeads.....	67
3.2.8.5	Imobilização Multipontual de LPP em Glioxil-Agarose 6BCL.....	68
3.2.8.6	Imobilização Multipontual das Lipases em Suportes Glioxil e Ativados com Glutaraldeído.....	68
3.2.8.7	Imobilização Multipontual das Lipases em Epóxi-Quitossana-Alginato.....	69
3.2.9	Cálculo dos Parâmetros de Imobilização.....	73
3.2.9.1	Cálculo da Concentração de Proteína Imobilizada.....	73
3.2.9.2	Cálculo da Atividade Recuperada.....	73
3.2.9.3	Cálculo do Fator de Estabilidade.....	74
3.2.9.4	Cálculo do Rendimento de Imobilização.....	74

3.2.10	Caracterização das Propriedades Bioquímicas da Lipase LTL Solúvel e Imobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS.....	74
3.2.10.1	Influência da Temperatura.....	74
3.2.10.2	Influência do pH.....	75
3.2.11	Síntese de Biodiesel por Transesterificação Enzimática.....	75
3.2.11.1	Etanólise do Óleo de Palma Catalisada por Lipases Imobilizadas por Ligação Covalente Multipontual.....	75
3.2.11.2	Etanólise do Óleo de Babaçu Catalisada por Lipases Imobilizadas por Ligação Covalente Multipontual.....	75
3.2.11.3	Etanólise do Óleo de Babaçu Catalisada por Lipases Imobilizadas em PHB.....	76
3.2.12	Purificação do Biodiesel.....	76
3.2.13	Quantificação dos Mono-ésteres de Etila (Biodiesel) Formados por Cromatografia de Fase Gasosa.....	77
3.2.14	Análise de Viscosidade das Amostras de Biodiesel.....	77
3.2.15	Cálculo do Rendimento de Transesterificação.....	78
3.2.16	Cálculo da Produtividade.....	78
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79

4.1	Imobilização Covalente Multipontual de Lipases em Suportes previamente Ativadas.....	80
4.1.1	Suporte Agarose 6BCL: Imobilização de Lipase de Pâncreas de Porco (LPP) em Gel de Agarose 6BCL.....	80
4.1.2	Suporte Agarose 6BCL: Imobilização de Lipases Microbianas (LTL, LPF, Lipex[®] 100L e CALB).....	81
4.1.2.1	Cinética de Imobilização e Influência do Tempo de Imobilização de Lipases Microbianas em Gel de Agarose.....	82
4.1.2.2	Efeito da Concentração de Proteína oferecida sobre as Propriedades Catalíticas dos Derivados de Agarose Ativados por Diferentes Protocolos.....	91
4.1.2.3	Agarose 6BCL: Influência do Protocolo de Ativação na Conversão em Butirato de Butila Catalisada por LTL e LPF.....	98
4.1.3	Suportes Agarose 10BCL e Sepabeads: Influência da Aminoação Química sobre as Propriedades Catalíticas de Lipases Microbianas Imobilizadas.....	100
4.1.3.1	Estabilidade Térmica de Derivados de BTL2 e CALB Imobilizadas em Glioxil-Agarose e Glioxil-Sepabeads: Efeito da Aminoação Química Sobre a Estabilização Térmica dos Derivados.....	105

4.1.3.2	Estabilidade de Derivados de BTL2 e CALB Imobilizadas em Glioxil-Agarose Incubados em Solventes Orgânicos: Efeito da Aminoação Química e do Tipo de Solvente Sobre a Atividade Catalítica dos Derivados.....	107
4.1.4	Imobilização de Lipase LTL em Complexos Polieletrólíticos (CPE) de Quitosana Hidrofobizados por TNBS e Laurinaldeído.....	108
4.1.4.1	Efeito do Tipo de Complexo Polieletrólítico, da Modificação Química com TNBS e do Agente de Ativação Sobre os Parâmetros de Imobilização.....	108
4.1.4.2	Influência do Tempo de Imobilização e Redução com Borohidreto de Sódio.....	120
4.1.4.3	Modificação Química do Hidrogel Quitosana-Alginato com Laurinaldeído.....	122
4.1.4.4	Efeito de Carga Máxima de Proteína sobre os Parâmetros de Imobilização de LTL Imobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS.....	123
4.1.4.5	Influência da Temperatura sobre a Atividade Hidrolítica de LTL Solúvel e Imobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS.....	125
4.1.4.6	Influência do pH sobre a Atividade Hidrolítica de LTL Solúvel e Imobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS.....	126
4.1.4.7	Síntese de Butirato de Butila por LTL Imobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS.....	127

4.1.5	Imobilização de LTL em Poli-(hidróxibutirato) (PHB) Ativado por Diferentes Agentes.....	128
4.1.6	Imobilização de Lipase em Bagaço de Cana-de-Açúcar Ativado por Diferentes Agentes.....	129
4.1.7	Imobilização de Lipases em Gel Amino-Toyopearl.....	131
4.1.8	Imobilização de Lipases em Suporte Híbrido Epóxi-Quitosa-Alginato.....	135
4.1.8.1	Influência do Tempo de Imobilização Sobre as Propriedades Catalíticas de LTL Imobilizada Covalentemente em Suportes Monofuncional e Heterofuncional.....	135
4.1.8.2	Influência do Carregamento de Proteína sobre as Propriedades Catalíticas dos Derivados de LTL, LPF e Lipex[®] 100L Imobilizados em Matrizes Epóxi.....	139
4.2	Imobilização de Lipases por Adsorção Física em Matrizes Hidrofóbicas.....	144
4.2.1	Imobilização de Lipases em Matrizes Hidrofóbicas Hexil-Toyopearl, Octil-Agarose e Octadecil-Sepabeads.....	144
4.2.2	Imobilização de Lipases por Adsorção Física em PHB.....	150
4.3	Seleção dos Derivados Preparados para a Síntese de Biodiesel.....	153

4.4	Etanolise de Óleos Vegetais Catalisada por Derivados de Lipases Seleccionados.....	163
4.4.1	Síntese de Biodiesel Catalisadas por Lipases LTL e LPF Imobilizadas em Matrizes Comerciais Agarose e Amino-Toyopearl.....	163
4.4.2	Síntese de Biodiesel Catalisada por LTL Imobilizada em Polieletrólito Quitosana-Alginato Hidrofobizado por TNBS.....	166
4.4.3	Síntese de Biodiesel Catalisada por Lipases Microbianas Imobilizadas em Diferentes Configurações de PHB.....	167
5	CONCLUSÕES.....	173
6	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	177
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179

1. INTRODUÇÃO

A crise do petróleo que se instaurou nas últimas décadas, aliada ao aumento da demanda por combustíveis e à crescente preocupação com o meio ambiente, preconizou a busca por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo. As pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos insumos básicos, de caráter renovável, para a produção de combustíveis que possam substituir os derivados de petróleo, o que coloca a biomassa em uma posição de destaque, em razão da sua natureza renovável, ampla disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (Suarez et al., 2009). A utilização da biomassa vegetal fonte de energia renovável contribui para a redução da emissão de dióxido de carbono no ar atmosférico (Antczak et al., 2009).

Óleos vegetais foram utilizados como combustível em automóveis no início do século 19 por Rudolph Diesel (Akoh et al., 2007; Antczak et al., 2009). No entanto, a utilização direta de óleos vegetais como combustível é insatisfatória e impraticável para uso em longo prazo devido à alta viscosidade e a formação de goma de oxidação, polimerização e deposição de carbono (Ranganathan et al., 2008). Os óleos vegetais são processados de modo a adquirir propriedades, tais como viscosidade semelhante aos combustíveis fósseis (Ma e Hanna, 1999).

O método tradicional de produção de energia a partir de óleos e gorduras é a transesterificação de óleos vegetais com alcoóis de cadeia curta e o produto obtido, uma mistura de mono-álquil ésteres (Akoh et al., 2007) é denominado biodiesel (Ranganathan et al., 2008; Vasudesan e Briggs, 2008; Antczak et al., 2009). Além dos óleos vegetais, o biodiesel também pode ser produzido a partir de outras fontes como gordura animal (sebo bovino, banha de porco), resíduos de óleos das indústrias de extração e restaurantes e óleo microalgal (Vasudesan e Briggs, 2008; Antczak et al., 2009). Os mono-álquil ésteres formados apresentam propriedades similares ao diesel convencional e podem ser empregados eficientemente como substitutos dos combustíveis fósseis (Antczak et al., 2009).

As reações de transesterificação podem ser realizadas por diferentes rotas, empregando diferentes catalisadores como álcalis, ácidos e enzimas, mais especificamente lipases (Ma e Hanna, 1999; Ranganathan et al., 2008; Vasudesan e Briggs, 2008; Antczak et al., 2009). A via química utiliza preferencialmente catalisadores alcalinos como os hidróxidos

de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) (Ma e Hanna, 1999). Apesar da excelente produtividade, a produção global de biodiesel é relativamente limitada, principalmente devido aos inconvenientes tais como a necessidade de aplicação de óleos vegetais refinados, problemas relacionados com a recuperação de puro glicerol e formação de sabões e pigmentos (Ranganathan et al., 2008). A produção de biodiesel catalisada por lipases, algumas das desvantagens acima referidas podem ser eliminadas e, portanto, processos enzimáticos são uma promissora alternativa à rota química (Urioste et al., 2008; Ranganathan et al., 2008).

A síntese de biodiesel é um processo em grande escala. Para que a aplicação de enzimas no setor industrial seja viável é necessário obter biocatalisadores termoestáveis (Antczak et al., 2009). A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma importante ferramenta para a estabilização da enzima, pois permite a sua reutilização e reduz a inativação por influência da temperatura e solventes orgânicos, o que pode ser atrativo para o setor industrial (López-Gallego et al., 2005; Guisán, 2006; Rodrigues et al., 2008). Uma etapa importante para a obtenção destes biocatalisadores é a seleção de um suporte e métodos de imobilização que permita obter biocatalisadores ativos e com elevada estabilização térmica (Mendes et al., 2008a).

Lipases têm sido imobilizadas em diferentes suportes de natureza orgânica e inorgânica empregando alguns métodos de imobilização tais como adsorção física, encapsulação, ligação covalente ou por reticulação (Dalla-Vecchia et al., 2004). O método de imobilização de lipases mais empregado no setor industrial é a adsorção física em suportes hidrofóbicos (Bornscheuer et al., 2002; Christensen et al., 2003). Este método de imobilização é de baixo custo, pois não é necessária a ativação do suporte e permite fácil reuso do suporte após vários ciclos (Secundo et al., 2008).

Durante a última década, vários suportes para imobilização de enzimas por ligação covalente também têm sido investigados com o objetivo de obter derivados termoestáveis e com elevada atividade catalítica, como géis glioxil e resinas epóxi (Mateo et al., 2000; Mateo et al., 2002; López-Gallego et al., 2005; Tardioli et al., 2003a,b; Mendes et al., 2006; Mateo et al., 2006; Rodrigues et al., 2008; Mendes et al., 2008a,b,c; Adriano et al., 2008). Estes suportes proporcionam condições ideais para a estabilização da enzima. Grupos epóxi são muito estáveis em pH neutro, mesmo em condições úmidas, podendo ser armazenados por longo período. Além disso, estes suportes são capazes de reagir com diferentes grupos nucleofílicos da enzima tais como amino, hidroxil ou tiol, com mínima

modificação química da proteína (Mateo et al., 2000; Mateo et al., 2003; Torres et al., 2003). Estes suportes têm sido extensivamente empregados para a estabilização de enzimas via ligação covalente multipontual (Mateo et al., 2000; Mateo et al., 2003; Torres et al., 2003; Mateo et al., 2007a). Imobilização em suportes glioxil permite também obter derivados termoestáveis, decorrente da intensa interação dos resíduos lisina da enzima com os grupos glioxil do suporte (Tardioli et al., 2003a,b; López-Gallego et al., 2005; Mateo et al., 2006; Adriano et al., 2008). Muitas enzimas têm sido altamente estabilizadas termicamente em géis glioxil (Mateo et al., 2006).

O objetivo principal deste trabalho foi preparar e selecionar derivados de lipases termoestáveis para aplicação em reações de transesterificação de óleos vegetais de baixo custo (óleos de babaçu e palma) visando a síntese de biodiesel pela rota etílica. O enfoque foi baseado no uso de preparações de lipases oriundas de fontes microbiana de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Candida antarctica* (CALB), *Bacillus thermocatenuatus* (BTL2), *Pseudomonas fluorescens* e Lipex® 100L e animal de pâncreas de porco (LPP) imobilizadas em géis de agarose 6BCL e 10BCL, amino-toyopearl, bagaço de cana, poli-(hidróxibutirato), sepabeads e epóxi-quitosana-alginato monofuncional e heterofuncional por ligação covalente e em matrizes hidrofóbicas octadecil-sepabeads, octil-agarose, hexil-toyopearl e poli-(hidróxibutirato) por adsorção física. Levando em consideração estes aspectos, o objetivo geral do projeto foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas:

⇒ Imobilização das preparações de lipases por diferentes protocolos e a determinação dos parâmetros de imobilização (proteína imobilizada, atividade hidrolítica, atividade recuperada, fator de estabilização das enzimas e síntese em meio aquo-restrito de butirato de butila);

⇒ Seleção dos derivados preparados com elevada atividade catalítica em meio aquoso e orgânico e termicamente estáveis;

⇒ Síntese de biodiesel por etanolise dos óleos de palma e babaçu catalisada pelos derivados imobilizados de lipases selecionados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enzimas como Biocatalisadores e suas Aplicações

As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial podem ser associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista, ou produtos contaminados, que requerem uma etapa posterior de purificação (Marchetti et al., 2007; Ranganathan et al., 2008; Antczak et al., 2009). As enzimas atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão atingindo velocidades de reação bastante superior aos catalisadores químicos convencionais, que normalmente são utilizados em condições extremas de reações (Krajewska, 2004; Hasan et al., 2006). Este comportamento das enzimas permite uma redução no custo final do processo, com a redução no consumo de energia e formação de subprodutos indesejáveis, devido à sua elevada especificidade que resulta em um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis e redução da quantidade de resíduos (de Castro et al., 2004).

Nesse contexto, o enfoque biotecnológico, vem se apresentando como uma opção interessante para sua exploração em diversos tipos de reações (de Castro et al., 2004; Hasan et al., 2006; Marchetti et al., 2007; Ranganathan et al., 2008; Antczak et al., 2009). As enzimas utilizadas nos setores industriais são quase em sua totalidade produzidas por microorganismos (Sharma et al., 2001; Hasan et al., 2006). A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação durante a década de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (Krajewska, 2004). Desde então, os processos enzimáticos tem sido aplicados em diversos setores, incluindo construção de biossensores, terapia enzimática, síntese enzimática de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústrias tradicionais como curtumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos e dentre outras aplicações (Hasan et al., 2006).

Para a crescente competitividade da tecnologia enzimática, a seleção de novas enzimas e a produção de enzimas recombinantes por tecnologia do DNA recombinante e da

engenharia de proteínas, permitiram a modificação de propriedades cinéticas e de estabilidade, o desenvolvimento de novas soluções ao nível da tecnologia de reatores enzimáticos e das técnicas de imobilização (Guisán, 2006). A utilização de enzimas vem de encontro aos pressupostos da chamada Química Verde.

De acordo com a reportagem da Business Communications Company Inc. o mercado global de enzimas para interesse industrial foi estimado em US\$ 2 bilhões de dólares em 2004 (Rajan, 2004). O crescimento no mercado de enzimas é de aproximadamente 4-5% ao ano, acompanhada pela redução de preço devido ao grande número de empresas que vem comercializando enzimas com preços mais competitivos. O crescimento para os próximos 4 anos também está estimado em torno de 3%, com estimativa para este ano de US\$ 2,4 bilhões de dólares para 2009 (Rajan, 2004). A Tabela 2.1. ilustra os principais consumidores de enzimas e o valor agregado gasto anualmente por estes setores.

Tabela 2.1. Mercado mundial de enzimas e aplicação (milhões de dólares).

Aplicações	2002	2003	2004	2009 (estimativa)	Crescimento anual (%)
Técnicas	978,2	1009,2	1040,0	1222,0	3,3
Alimentos	701,0	720,0	740,0	863,0	3,1
Ração animal	210,8	215,6	220,0	267,0	3,9
Total	1890,0	1945,0	2000,0	2352,0	3,3

Fonte: Rajan (2004).

Este mercado se divide em três segmentos de aplicação como (i) enzimas técnicas, (ii) enzimas utilizadas por indústrias de alimentos e (iii) para alimentação animal. O mercado consumidor que mais cresce é aquele destinado à alimentação de animais, em torno de 4% ao ano. As enzimas destinadas aos setores de alimentos são utilizadas na produção de xarope de açúcar invertido e para a produção de compostos aromatizantes (Hasan et al., 2006). Enzimas técnicas são utilizadas na formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couros e produção de fármacos. Este é o principal mercado consumidor de enzimas, aproximadamente 50% do total de enzimas comercializadas no mercado. As enzimas mais utilizadas no setor industrial são as proteases, 40% do mercado enzimas, seguido de carboidrases e lipases (Sharma et al., 2001).

2.2. Lipases

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster- carboxílicas de acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes com baixa concentração de água (de Castro et al., 2004).

A principal aplicação das lipases está relacionada à sua atuação como componente funcional de misturas enzimáticas na formulação de detergentes (Sharma et al., 2001; de Castro et al., 2004; Hasan et al., 2006). A idéia da utilização de lipases neste campo não é nova, mas o grande marco da utilização de lipases na formulação de sabão em pó ocorreu em 1988, quando a empresa Novozymes lançou no mercado um produto contendo lipase fúngica de *Thermomyces lanuginosus* denominado comercialmente de “Lipolase”. Outros produtos, como o “Lumafast” (Genencor) e o “Lipomax” (Gist Brocades), contêm lipases extracelulares de *Pseudomonas* com estabilidade e atividade adequadas sob as condições de lavagem (Jaeger et al., 1994).

Na indústria de couro, lipases podem ser empregadas em conjunto com outras hidrolases para a remoção de gordura subcutânea e pelos (Hasan et al., 2006). Na indústria de polpa e papel, triglicerídeos e ceras contidas na madeira na remoção do “pitch” que dificultam o processo de produção de papel podem ser removidos pelo emprego de lipases (Jaeger e Reetz, 1998). Além disso, as lipases podem ser empregadas na produção de fármacos, cosméticos, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, resolução de racematos, produção de aromas e fragrâncias e modificações de lipídeos para a produção de biodiesel (Sharma et al., 2001). Atualmente, a utilização de lipases para a produção de biodiesel também representa um campo de vasta aplicação para estas enzimas, sendo essa aplicação objeto do presente projeto.

2.2.1. Fontes e Propriedades

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Inicialmente, eram obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998; de Castro et al., 2004). Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Entretanto, os recentes avanços registrados na tecnologia do DNA, têm permitido aos fabricantes de enzimas colocar no mercado lipases microbianas com uma alta atividade a um custo acessível, empregadas principalmente na formulação de detergentes, indústrias de papel e celulose, alimentos e química (Hasan et al., 2006).

As enzimas produzidas por fermentação microbiana são em sua maioria extracelulares, fato que facilita os processos de extração e purificação e conferindo maior estabilidade. A produção de enzimas por via microbiana permite fácil controle das condições de cultivo e pode ser realizada em escala industrial com baixos custos. O rápido crescimento celular é um outro fator importante na produção de enzimas dessa fonte (Jaeger et al., 1999). As lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras. Uma publicação de 1998 sobre a disponibilidade comercial de lipases listou enzimas de 34 diferentes fontes microbianas, incluindo 18 a partir de fungos e 7 de bactérias (Jaeger e Reetz, 1998).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 KDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C (Vulfson, 1994).

2.2.2. Reações Catalisadas pelas Lipases

As lipases catalisam uma série de diferentes reações, como ilustrado na Figura 2.1 (de Castro et al., 2004). Além de clivar as ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (Yahya et al., 1998; de Castro et al., 2004). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (Hasan et al., 2006). Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (Yahya et al., 1998).

A modificação enzimática de lipídeos foi dramaticamente desenvolvida nos últimos 30 anos, a partir de uma simples idéia de laboratório, no início, e atualmente uma realidade industrial. Várias empresas têm organizado seus esforços para explorar a utilização de enzimas em diferentes setores da indústria. Até agora, mais de 10 empresas internacionais empregam a tecnologia enzimática para o desenvolvimento de produtos e da produção industrial (Xu, 2003). Importantes indústrias do setor químico como a BASF, com sede em Ludwigshafen na Alemanha e com várias filiais em diversos países do mundo, inclusive no Brasil, empregam lipases, especificamente de *Candida antarctica*, em processos de larga-escala na resolução de aminas e álcoois quirais para a síntese de intermediários de fármacos e agrotóxicos, com produção anual superior a 2000 toneladas/ano (Bornscheuer et al., 2002).

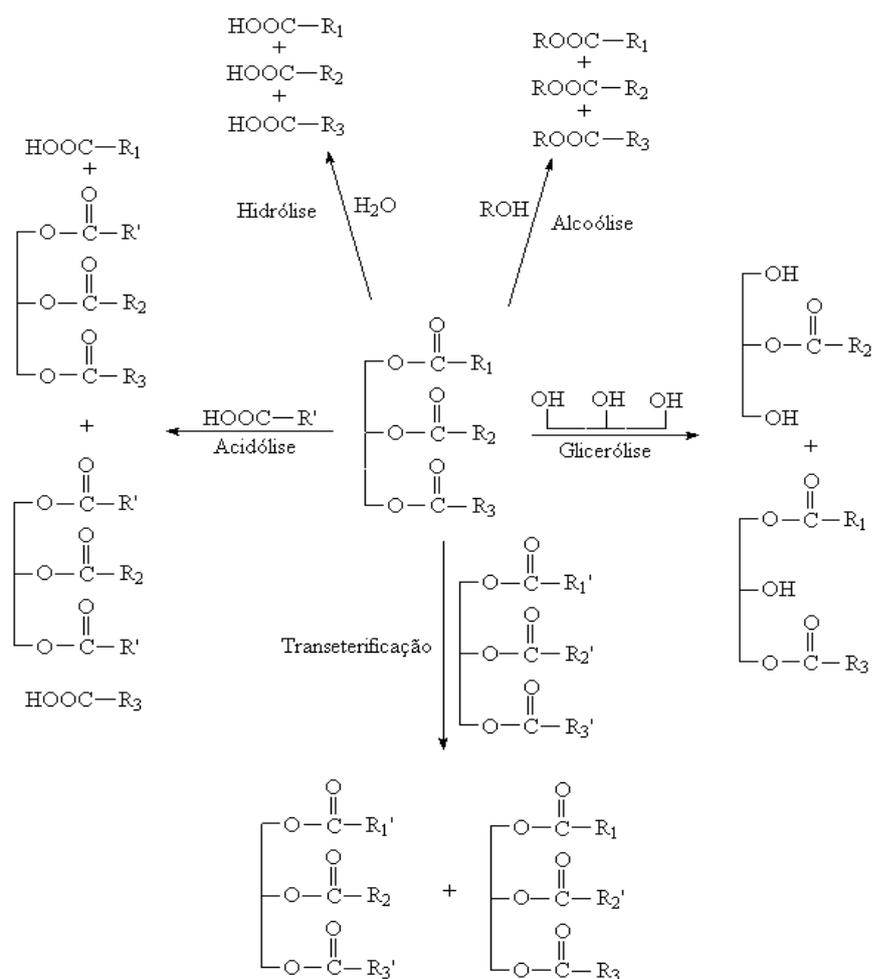


Figura 2.1. Reações catalisadas pelas lipases.

Fonte: de Castro et al. (2004).

Outros produtos como substitutos da gordura do leite materno (HMFS), análogos da manteiga de cacau (CBE), compostos aromatizantes, di- (DAG) e monoacilgliceróis (MAG), ácidos graxos poliinsaturados concentrados e precursores de fármacos também são produzidos em escala industrial empregando lipases como biocatalisador (Xu, 2003; Bickerstaff, 2009). Estes avanços são atribuídos, em grande parte, ao estudo da aplicação de lipases em meios não-convencionais. Tradicionalmente, este tipo de enzima (hidrolase) é empregado na hidrólise de triacilgliceróis. Sob estas condições, ocorre somente a hidrólise, que pode ser aplicada para um número reduzido de biotransformações de lipídeos. Embora a hidrólise de lipídeos seja conhecida há décadas, antes da descoberta de possíveis utilizações de enzimas em meios não-convencionais, nenhuma aplicação industrial tinha sido realmente empregada. Em 1984, Zaks e Klibanov publicaram um artigo, relatando

que lipases poderiam ser utilizadas em meios aquo-restritos. Este trabalho foi importante na história das enzimas, pois permitiu investigar uma grande variedade de aplicações potenciais de lipases em meios não aquosos.

A aplicação de lipases nestas reações pode ser realizada devido à *(i)* elucidação das estruturas tridimensionais das enzimas pela engenharia de proteínas; *(ii)* estudo do mecanismo de reação de lipases (ativação interfacial); *(iii)* utilização da engenharia genética na produção de enzimas recombinantes e *(iv)* adoção de métodos de imobilização da enzima (de Castro et al., 2004).

2.2.3. Mecanismo de Atuação

As lipases são definidas como glicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3) que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são classificadas, genericamente, como esterases (Verger, 1997).

A diferença entre lipases e esterases também tem sido feita pela especificidade preferencial dessas duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa (ligações ésteres tríplexes), enquanto esterases atuam sobre mono-ésteres, liberando ácidos graxos de baixa massa molecular (Brockman, 1984). Deve-se enfatizar, que a maioria das lipases podem hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger et al., 1999).

As reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídeo, podendo em alguns casos impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, as quais só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea (Sharma et al., 2001). Substratos lipolíticos usualmente formam um equilíbrio entre os estados monoméricos, micelares e emulsificados, resultando na necessidade de um modelo de sistema adequado ao estudo da cinética de lipase. Nos estados monoméricos, as lipases são incapazes de agir, pois os lipídeos se encontram solúveis no meio aquoso. O fenômeno mais conhecido nos estudos cinéticos recentes de reações lipolíticas é a “ativação interfacial”, a qual relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis

emulsificados (Verger, 1997; Jaeger e Reetz, 1998; Bastida et al., 1998; Palomo et al., 2002).

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Mucor miehei* e da lipase pancreática humana, propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas encontra-se sob uma tampa hidrofóbica ou “*lid*” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença dessa tampa na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases (Verger, 1997; Bastida et al., 1998; Palomo et al., 2002). Recentemente, revelou-se que a presença da tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e a lipase pancreática humana não mostraram ativação interfacial, embora apresentem uma tampa anfifílica sobre seus sítios ativos. Esta observação sugere que a presença de uma tampa hidrofóbica sobre o sítio ativo e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como a lipase. Portanto, a definição atual é bastante simples: uma lipase é uma carboxil-esterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa (Jaeger e Reetz, 1998).

Uma das principais dificuldades na compreensão do mecanismo de hidrólise é a dependência da atividade das lipases das propriedades físicas da emulsão, ou seja, a disposição de substratos lipolíticos à lipase (Brockman, 1984). O uso de substratos solúveis em água, tais como o *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP), cuja hidrólise é rápida e pode ser acompanhada espectrofotometricamente, não é, contudo, o mais adequado para a determinação da atividade da lipase, devido à interferência de esterases (Erdmann et al., 1990). O método mais utilizado para determinar a atividade das lipases é a titulação dos ácidos graxos formados pela hidrólise do triglicérido, em geral, a trioleína, produzidos numa emulsão estabilizada com um agente tensoativo (Soares et al., 1999; Foresti e Ferreira, 2007; Andrewes et al., 2007). Apesar do efeito dos agentes emulsificantes em lipases não ter sido extensivamente estudado, a goma arábica é o agente tensoativo mais utilizado, conduzindo elevada atividade lipolítica (Verger, 1997). Os tensoativos iônicos não são empregados em hidrólises de lipídeos, quando se utiliza o método titrimétrico como método analítico, pois podem deslocar o equilíbrio iônico.

Entre os tensoativos não iônicos, o Triton X-100 é o mais empregado em ensaios de hidrólise de triglicéridios (Palomo et al., 2005; Fernández-Lorente et al., 2007). O

uso de tensoativo para estabilizar emulsões na determinação de atividade lipolítica, deve ter em conta que a atividade da lipase varia tanto em função do tipo de tensoativo, como da sua concentração (Fernández-Lorente et al., 2007). A lipase na ausência de tensoativos ou interface orgânica se encontra na conformação fechada, como ilustrado na Figura 2.2 (Fernández-Lorente et al., 2007).

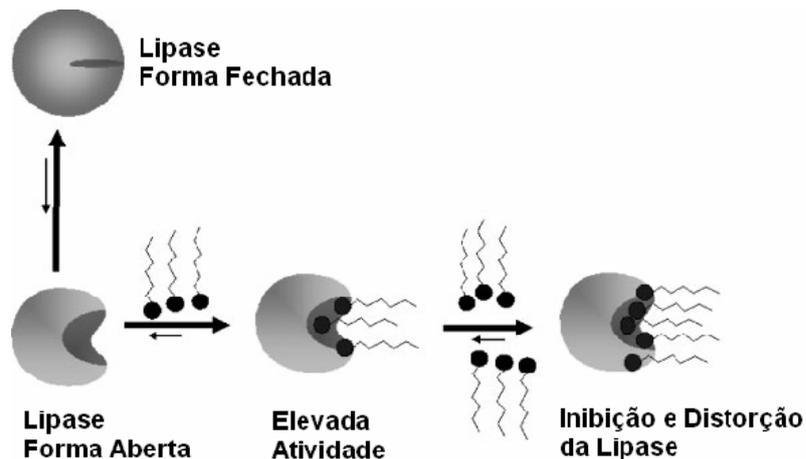


Figura 2.2. Mecanismo da influência de tensoativos sobre a atividade catalítica de lipases.
Fonte: Fernández-Lorente et al. (2007).

Com a adição de tensoativo, o equilíbrio é deslocado para a conformação aberta, atingindo máxima atividade catalítica. No entanto, o aumento da concentração de tensoativo, acima da sua concentração micelar crítica (CMC), pode inibir a atividade da enzima decorrente da forte interação do tensoativo com o sítio ativo da enzima, podendo distorcer a sua estrutura ativa (Fernández-Lorente et al., 2007). A adição de tensoativos pode alterar as propriedades catalíticas da lipase por dois mecanismos: o primeiro é a interação do tensoativo com o sítio catalítico da enzima que pode inibir competitivamente e reduzindo a afinidade da enzima pelo substrato (aumento do valor de K_m) e o outro é o deslocamento do equilíbrio para a sua conformação aberta que promove um aumento da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da enzima (Fernández-Lorente et al., 2007). O efeito dos tensoativos sobre a atividade hidrolítica das lipases (ativação ou inibição) é particularmente importante na indústria de detergentes, onde as lipases são usadas na remoção de lipídeos (Xia et al., 1996).

2.3. Imobilização de Enzimas: Suportes

Nos últimos anos, a utilização de enzimas na indústria cresce sensivelmente devido às vantagens frente aos catalisadores químicos como elevada atividade catalítica, especificidade por determinado substrato e elevada atividade em condições brandas de temperatura e pressão (Sharma et al., 2001; Hasan et al., 2006). A grande desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel é a sua separação para posterior aplicação, assim como a contaminação do produto desejado, pois enzimas são compostos solúveis em água (López-Gallego et al., 2005; Guisán, 2006). A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso (Guisán, 2006). As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização são: o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas, permitindo a sua reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica (López-Gallego et al., 2005; Guisán, 2006). As principais desvantagens deste processo são: alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização (Arroyo, 1998).

Enzimas podem ser imobilizadas de muitas maneiras, isto é, podem ser imersas em gel ou microcápsulas; podem ser adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica; podem ser copolimerizadas com algum monômero; podem se ligar a uma matriz polimérica insolúvel e ainda por ligações covalentes (Villeneuve et al., 2000; Dalla-Vecchia et al., 2004).

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do derivado, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (Malcata et al., 1990).

As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo e outras. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos e também podem ser classificados conforme sua morfologia como

materiais porosos, não-porosos e de estrutura de gel (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Os materiais porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, onde a enzima fica protegida dos efeitos de turbulência externa. Como a maior parte da área disponível para a imobilização está na estrutura interna, deve-se atentar para que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Os materiais não-porosos eliminam a resistência de massa interna, mas apresentam baixa área superficial disponível à ligação da enzima. Este problema pode ser parcialmente superado pela utilização de partículas finas ou fibras, porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam partículas muito finas, como por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos.

Os polímeros naturais e sintéticos são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores (Mateo et al., 2000; Mateo et al., 2002; Mateo et al., 2006; Mateo et al., 2007). Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, porém os polímeros naturais levam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradáveis não causando danos ao meio ambiente (Dalla-Vecchia et al., 2004). Dentre os diferentes suportes empregados na imobilização de enzimas podem ser destacados os suportes orgânicos naturais agarose e hidrogéis de quitosana ou polieletrólitos de quitosana com biopolímeros naturais e resinas acrílicas comerciais (polímeros sintéticos) Toyopearl e Sepabeads visto pelo grande número de trabalhos publicados (Mateo et al., 2000; Palomo et al., 2002; Mateo et al., 2002; López-Gallego et al., 2005; Tardioli et al., 2003a,b; Torres et al., 2003; Mendes et al., 2006; Mateo et al., 2007a,b; Mendes et al., 2008a,b,c; Rodrigues et al., 2008; Adriano et al., 2008).

2.3.1. Resina de Afinidade Toyopearl AF-Amino-650M

A empresa Tosoh Bioscience com sede no Japão e com filiais na Alemanha e Estados Unidos comercializam resinas acrílicas de afinidade chamadas Toyopearl com diferentes propriedades para processos de separação e purificação de compostos orgânicos,

normalmente proteínas (www.tosohbioscience.com). Estas resinas apresentam diferentes grupos químicos em sua estrutura com o objetivo de se ligarem em diferentes grupos reativos. Estas resinas são hidrofílicas, com alta porosidade para que possa acomodar proteínas de alta massa molecular, aproximadamente 1000 Å de diâmetro de poros, e diâmetros de partículas da ordem de 40-90 µm, com aplicações em escalas laboratorial e industrial. Elas podem ser empregadas na síntese de peptídeos e oligonucleotídeos devido à sua excelente estabilidade em diferentes solventes orgânicos e em condições extremas de pH. De acordo com o catálogo informativo fornecido pela Tosoh Bioscience, estas resinas são divididas em três classes; resinas ativadas que não necessitam de reagentes químicos para a estabilização do complexo resina/ proteína; resinas específicas que possuem mecanismos de ligação distintos (quelação e adsorção) e resinas reativas que necessitam destes agentes na estabilização do complexo.

Resinas ativadas Toyopearl AF-Tresil-650M e Toyopearl AF-Epóxi-650M possuem em sua estrutura cerca de 20 µmoles de grupos tresil e ≥ 100 µmoles de grupos epóxi.mL⁻¹ de resina úmida. Estas resinas sofrem ataque nucleofílico de grupos amino e tiol de proteínas ideais na imobilização de proteínas, carboidratos e glicoproteínas. Resinas específicas Toyopearl AF-Quelato-650M, Toyopearl AF-Blue HC-650M e Toyopearl AF-Red-650M são bastante empregadas na purificação de polimerases, ciclasas, transferases e albumina. Resinas reativas são representadas por Toyopearl AF-Carbóxi-650M, Toyopearl AF-Formil-650M e Toyopearl AF-Amino-650M. Estas resinas possuem alta densidade de grupos reativos em sua estrutura e também são empregadas em processos de purificação e separação de diferentes proteínas, conforme mostrado na Tabela 2.2.

Estas resinas se ligam covalentemente aos grupos reativos da enzima e requerem agentes químicos para estabilizar as ligações AF-Formil-650M e AF-Amino-650M que necessitam de cianoborohidreto de sódio para reduzir as bases de Schiff (ligações iminas) após reação covalente com a proteína para a obtenção de um derivado inerte e AF-Amino-650M e AF-Carbóxi-650M necessitam de carbodi-imida.

Tabela 2.2. Concentração de proteína imobilizada em diferentes resinas acrílicas comercializadas pela empresa Tosoh Bioscience.

PI (mg.mL ⁻¹ de gel)	AF-Tresil- 650M	AF-Formil- 650M	AF-Amino- 650M	AF-Carbóxi- 650M
Inibidor de Tripsina de Soja	16,0	3,50	5,80	15,0
Concanavalina A	13,0	-	-	-
α-Quimotripsina	12,5	-	-	-
Mioglobina	12,4	-	-	-
Ovalbumina	-	2,50	6,70	0,80
Albumina de Soro Bovina	12,4	14,0	19,2	3,30
Imunoglobulina Humana	10,0	15,0	6,70	11,7
Lisozima	60,0	20,0	5,80	17,5

PI: Proteína Imobilizada (mg.mL⁻¹ de gel).

Fonte: www.tosohbioscience.com

A resina AF-Amino-650M possui cerca de 90 μmoles de grupos amino.mL⁻¹ de resina úmida e diâmetro de partícula e poro de 6500 e 1000 Å, respectivamente, e estabilidade em uma ampla faixa de pH (2-13), condições ideais em processos de imobilização de enzimas (www.separations.us.tosohbioscience.com). Este suporte apresenta também grupos hidroxilas que podem ser importantes no processo de imobilização, como mostrado na Figura 2.3.

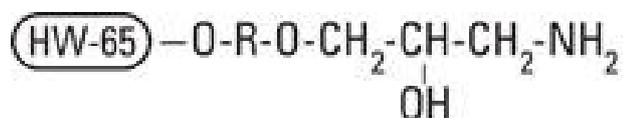


Figura 2.3. Estrutura química da resina acrílica Toyopearl AF-Amino-650M.

Diferentes agentes de ativação como glicidol e epícloridrina reagem preferencialmente com os grupos hidroxila, produzindo géis glioxil e os grupos amino podem reagir com glutaraldeído, um agente bifuncional bastante empregado em técnicas de imobilização, o que torna interessante o uso desta resina como matriz de imobilização de enzimas. Outra importante característica é a sua elevada capacidade de adsorver corantes hidrofóbicos (rosa de bengala), mostrando ter caráter hidrofóbico (Mendes et al., 2008a). De acordo com a literatura, o uso desta resina no processo de imobilização de lipases não é relatado. Apesar de suas excelentes propriedades, este suporte apresenta um custo bastante elevado, US\$ 530,00 o frasco contendo 100 mL de resina, tornando inviável a sua aplicação em biotransformações em escala industrial.

2.3.2. Poli-Hidróxibutirato (PHB)

Poli-hidróxibutirato (PHB), um derivado da família dos poli-hidróxialcanoatos (PHA) são poliésteres estruturalmente simples, sintetizados por muitos micro-organismos como substâncias naturais de reserva de carbono e de energia (Squio e Aragão, 2004). São acumulados pela célula microbiana em forma de grânulos, podendo chegar até 90% em massa seca (Kai et al., 2003). Estes biopolímeros são produzidos em condições de crescimento não balanceadas proporcionadas pela limitação de um nutriente, entre outros, como fonte de nitrogênio e fósforo e excesso da fonte de carbono (Squio e Aragão, 2004). Mais de 100 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHA sintetizados por organismos naturais ou recombinantes, o que demonstra a grande diversidade de PHA que podem ser produzidos (Kai et al., 2003; Squio e Aragão, 2004). Entre os PHA mais estudados e produzidos industrialmente, estão o poli-hidróxibutirato (PHB) e o poli-hidróxibutirato-*co*-hidróxivalerato (PHB-*co*-HV) (Kai et al., 2003).

Na literatura são reportadas diversas linhagens empregadas na produção de poli-hidróxialcanoatos, especialmente PHB, tais como *Ralstonia eutropha* que tem sido utilizada na produção industrial, por apresentar elevada produção e em alto rendimento do biopolímero. Entretanto, a linhagem original (*Alcaligenes eutrophus* H16) só utiliza alguns tipos de açúcares e, embora espécies mutantes (*R. eutropha* DSM 545, *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599) possam crescer em glicose, não podem hidrolisar sacarose. Outro microorganismo com grande potencial para a produção industrial é *Burkholderia sacchari*, isolado de solo de canavial brasileiro (Squio e Aragão, 2004).

O PHB pode ser utilizado como matéria-prima em um amplo campo de aplicações, como embalagens para produtos de limpeza, higiene, cosméticos e alimentos (Squio e Aragão, 2004). Também servem para produzir sacos descartáveis, vasos para crescimento de mudas, brinquedos e material escolar. Além disso, por serem biocompatíveis podem ser empregados na área médico-farmacêutica em fabricação de fios de sutura, próteses ósseas, suportes de culturas de tecidos para implantes e encapsulação de fármacos para liberação controlada (Kai et al., 2003; Squio e Aragão, 2004). Este material apresenta alta cristalinidade e hidrofobicidade (Kai et al., 2003). Por se tratar de um material biodegradável e de caráter hidrofóbico, torna-se um material promissor na imobilização de enzimas,

especificamente lipases (Mendes et al., 2008d). Porém a sua aplicação como matriz para a imobilização de enzimas ainda não é relatada na literatura.

2.3.3. Bagaço de Cana-de-Açúcar

Os lignocelulósicos são os materiais orgânicos mais abundantes da biosfera, representando aproximadamente 50% da biomassa vegetal (Cunha et al., 2005) e podem ser usados como matéria-prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos e bens de consumo diversos (Latif e Rajoca, 2001). O Brasil, com sua grande extensão territorial, apresenta alto potencial de exploração de recursos renováveis para a geração de diversos insumos. Um resíduo abundante no país e proveniente de material renovável é o bagaço de cana-de-açúcar, pois o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com uma produção estimada de aproximadamente 570 milhões de toneladas no ano de 2008, segundo dados do Ministério da Agricultura (Ministério da Agricultura - Brasil, 2008).

A indústria sucroalcooleira produz cerca de 250-280 kg de bagaço por tonelada de cana moída o que correspondeu a uma produção de bagaço de aproximadamente 140 milhões de toneladas no ano de 2008 (Ministério da Agricultura - Brasil, 2008). Grande parte deste resíduo é utilizado pela própria usina como fonte de energia (Cunha et al., 2005). Embora o bagaço possa ser utilizado para a geração de energia ou como suplemento em ração animal, ainda há um grande excedente que pode ser empregado para a produção de diversos bens à sociedade. Algumas alternativas para sua utilização como matéria-prima são a produção de etanol, hidroximetilfurfural, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, enzimas e xilitol (Cunha et al., 2005). Outra aplicação do bagaço é a sua utilização como matriz no processo de imobilização de enzimas. Na literatura é relatada a aplicação de vários resíduos lignocelulósicos tais como fibra de coco verde (Brígida et al., 2007), palha de arroz (Freitas et al., 2003) e celulignina (Pérez et al., 2007) na imobilização de lipases. Porém, o uso de bagaço de cana-de-açúcar ainda é pouco explorado.

2.3.4. Quitosana

A quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (George e Abraham, 2006). É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado. Este biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (Krajewska, 2004). Grupos hidroxil (OH) estão dispostos na estrutura geral dos biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH_2) na estrutura da quitosana. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (Berger et al., 2004). A Figura 2.4 mostra a estrutura química dos biopolímeros celulose, quitina e quitosana.

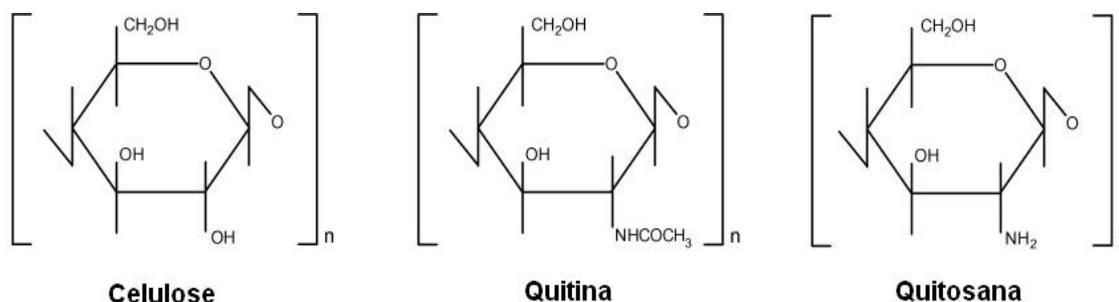


Figura 2.4. Estrutura dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose.

A quitina é frequentemente obtida de exo-esqueletos de crustáceos como, por exemplo, de caranguejo e camarão. O biopolímero é adicionado em uma solução aquosa fria de HCl 2% para a remoção de compostos minerais como carbonato de cálcio. Em seguida, é realizada a hidrólise alcalina a quente em solução aquosa de NaOH 5% (m/m) para a remoção de proteínas. Após esta etapa, obtém-se a quitina com um grau de acetilação superior a 50% (Gupta e Jabrail, 2006). Para a obtenção da quitosana, a quitina é desacetilada com solução de NaOH a 50% (m/m) a 60 °C (Krajewska, 2004). O grau de desacetilação da

quitosana é controlado por esta etapa, podendo atingir total desacetilação empregando hidrólise alcalina em etapas consecutivas.

Na etapa de desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil da quitina é rompida com formação de unidades de D-glucosamina que contém um grupo amino livre. Entretanto, a quitosana não é uma macromolécula quimicamente uniforme, apresentando diferentes graus de desacetilação. Acima de 30% de desacetilação, o material já pode ser considerado quitosana, sendo que as aplicações e características dessa macromolécula dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e tamanho da cadeia polimérica (Berger et al., 2004). Este biopolímero tem três tipos de grupos reativos funcionais, um grupo amino na posição C-2 e duas hidroxilas, uma primária e outra secundária, nas posições C-3 e C-6, respectivamente (Li e Bai, 2005). É solúvel em diversos ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos (Kumar, 2000).

A maioria das indústrias que produzem quitina e quitosana em escala comercial está localizada no Japão, onde mais de 100 bilhões de toneladas de quitosana são manufaturadas por ano, a partir de carapaças de caranguejo e camarão (Tsigos et al., 2000). Nestas indústrias, a quitosana é produzida a partir da quitina via processo termoquímico por hidrólise alcalina que promove a desacetilação da quitina, normalmente com NaOH (40-50% m/m) a 110-115 °C. Entretanto, os principais fatores que afetam o grau de desacetilação e, conseqüentemente, as características da quitosana obtida são a temperatura e tempo de reação e concentração da solução de álcali, razão quitina/álcali, tamanho das partículas da quitina e presença de agentes que evitem a despolimerização (Campagna-Filho e Signini, 2001).

Para produzir 1 kg de quitosana 70% desacetilada a partir de carapaças de caranguejo, são necessários 6,3 kg de HCl, 1,8 kg de NaOH, 0,5 t de água para o processo e 0,9 t de água de resfriamento (Kumar, 2000).

São diversas as aplicações da quitosana, entretanto verifica-se uma centralização para uso na purificação de água, no processamento de alimentos e na quelção de íons metálicos (Kumar, 2000; Krajewska, 2004). A quitosana atua como floculante e coagulante nos processos de tratamento de efluentes industriais e também pode ser utilizada na remoção de petróleo proveniente de derramamentos no mar, contribuindo na solução de um dos grandes problemas ambientais (Kumar, 2000). No tratamento de efluentes industriais com elevados teores de metais pesados, a quitosana age como agente quelante na remoção de metais pesados e resíduos, devido à presença de diferentes grupos funcionais, que podem ser

usados para aumentar a eficiência de remoção de íons metálicos. O grupo funcional NH₂ da quitosana é de grande interesse devido à habilidade de formar ligações coordenadas covalentes com íons metálicos. Trabalhos têm sido realizados na remoção de metais pesados, como cobre, chumbo, cádmio e mercúrio (Li e Bai, 2005).

Também tem sido utilizada para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como cosméticos, agentes de liberação controlada de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos (Kumar, 2000; Krajewska, 2004; Altun e Cetinus, 2007).

Na indústria química, a quitosana é largamente utilizada para aplicações em cosméticos, por sua natureza fungicida (Krajewska, 2004), na produção de filmes fotográficos, por sua resistência à abrasão, características ópticas e facilidade de obtenção de filmes (Kumar, 2000), na indústria papelreira, aumentando a resistência mecânica e a impermeabilidade do papel e também na curtição e acabamento de artefatos de couros (Krajewska, 2004).

Outra importante aplicação de quitosana é sua aplicação em imobilização de enzimas (Krajewska, 2004; Berger et al., 2004; Chiou e Wu, 2004; de Oliveira et al., 2006; Altun e Cetinus, 2007). De acordo com a literatura, diversas enzimas de diferentes fontes são imobilizadas para diferentes aplicações (Chiou e Wu, 2004; de Oliveira et al., 2006; Altun e Cetinus, 2007). Sua aplicação como suporte para a imobilização de enzimas se deve às suas diferentes configurações geométricas como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras e outras. Os biopolímeros quitina e quitosana são comercializados pela empresa Sigma-Aldrich nas formas em pó e escamas e em forma de hidrogel (Chitopearl), comercializada pela empresa japonesa Fuji Spinning Co. Ltda (Krajewska, 2004). Na literatura, são relatados também diferentes tipos de preparação de quitosana, nas formas de membranas, capsulas, fibras e esponjas sintetizadas por diferentes procedimentos, alterando as propriedades físicas do polissacarídeo para aumentar a sua estabilidade e durabilidade (Krajewska, 2004). Esta estratégia permite obter um suporte apropriado para os diferentes procedimentos de imobilização. Uma outra propriedade importante é a presença de diferentes grupos funcionais, grupos hidroxila e amino, que permitem a utilização de diferentes métodos de imobilização (Chiou e Wu, 2004).

Devido à sua baixa estabilidade em pH ácido, diversas alternativas são propostas para aumentar sua estabilidade como reticulação com agentes bifuncionais para a

formação de géis mais resistentes ou a aplicação de outros biopolímeros como carragenina, gelatina e alginato. Estas técnicas têm sido utilizadas para diversas aplicações como liberação controlada de fármacos e como suporte para a imobilização de enzimas (Berger et al., 2004; Adriano et al., 2008).

2.3.4.1. Princípio de Formação de Complexos Polieletrólíticos de Quitosana

Hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, capazes de adsorverem grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Estas matrizes são insolúveis em água devido à presença de pontos de reticulação química ou física (Berger et al., 2004). Este fato se deve aos grupos ionizáveis presentes na estrutura dos biopolímeros como grupos amino, carboxílicos e hidroxilas que possuem afinidade com a molécula de água. Os hidrogéis têm uma vasta aplicação no campo biomédico e farmacêutico como sistemas de liberação controlada de fármacos (Berger et al., 2004; Gonçalves et al., 2005). Uma vez que os hidrogéis podem ser preparados com uma vasta gama de tamanhos de poros eles podem ser utilizados tanto na liberação de fármacos de pequena massa molecular como, por exemplo, agentes anti-inflamatórios, antissépticos e solutos de elevada massa molecular, como proteínas, fatores de crescimento, entre outros (Kumar, 2000). Os hidrogéis podem ser constituídos de um ou mais biopolímeros (Berger et al., 2004).

De acordo com a literatura, a quitosana é um dos principais compostos empregados na síntese de hidrogéis, como também alginato, carragenina, gelatina e outros (George e Abraham, 2006). Os complexos polieletrólitos de quitosana são formados com o objetivo de obter hidrogéis mais versáteis, com diferentes estruturas química e física, o que pode melhorar sua atuação em uma determinada aplicação (Berger et al., 2004). Uma outra importante aplicação dos hidrogéis é na imobilização de enzimas para diversas aplicações, principalmente no desenvolvimento de biossensores (de Oliveira et al., 2006). Sua estrutura é mantida por interações iônicas ou covalentes. As ligações iônicas são fortemente influenciadas pelo pH do meio reacional, influenciando também na capacidade de retenção de água no hidrogel. A Figura 2.5 mostra a influência do pH sobre a estrutura do hidrogel (Berger et al., 2004).

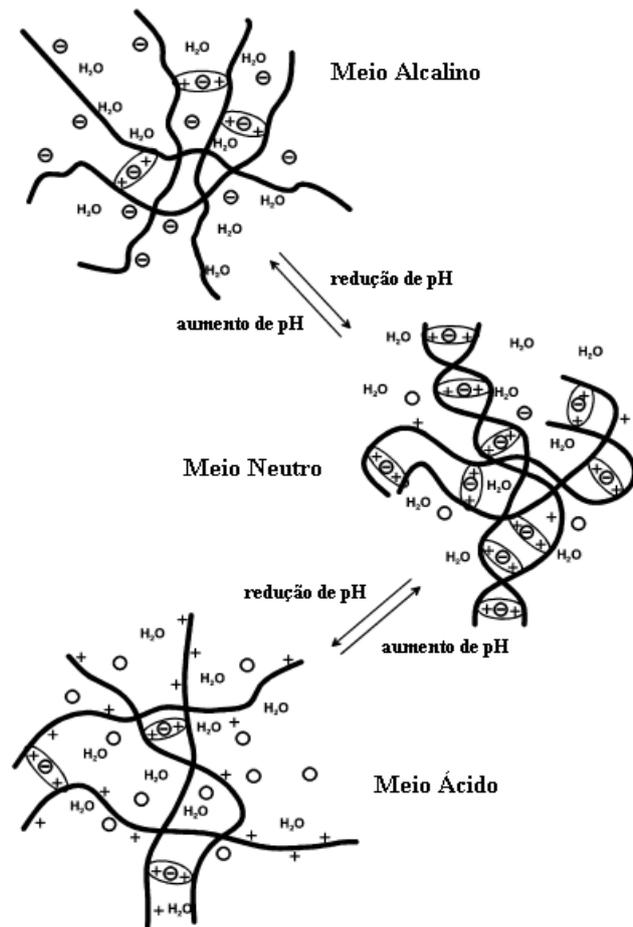


Figura 2.5. Influência do pH sobre a estrutura do hidrogel.
 Fonte: Berger et al. (2004).

Se o pH decresce, ocorre a protonação dos grupos amino da quitosana, resultando na repulsão eletrostática e enfraquecimento da resistência mecânica e química do hidrogel. A concentração de água no hidrogel é aumentada consideravelmente porque em meio ácido o grau de inchamento é favorecido (Berger et al., 2004). Em sistemas de liberação controlada de fármacos foi observado que, em meio ácido esta liberação é facilitada devido à maior difusão dos fármacos nos poros do hidrogel (Gonçalves et al., 2005). Em meio fortemente ácido ocorre total dissolução do hidrogel. Com o aumento do pH do meio reacional, a protonação da quitosana decresce e também reduz a interação entre os polímeros que formam a estrutura do hidrogel. Neste meio, os grupos carregados negativamente como, por exemplo, grupos carboxílicos, se encontram na forma iônica e os grupos amino da quitosana se encontram desprotonados. Em altos valores de pH, a liberação controlada de fármacos é menor se comparada com o meio ácido porque o grau de inchamento do hidrogel é

inferior. A molécula de água interage mais facilmente com os grupos amino protonados para a formação de íons hidroxônio. Em pH próximo da neutralidade, há equilíbrio entre as cargas do hidrogel que promove interação máxima entre os grupos ionizáveis, proporcionando maior estabilidade ao gel.

Diferentes compostos são utilizados, juntamente com a quitosana, para a formação de hidrogéis de complexos polieletrólíticos tais como gelatina, alginato, carragenina, entre outros. Alginato é um polissacarídeo extraído de algas marrons. A estrutura química do alginato é constituída por polímero linear do ácido L-gulurônico e do ácido D-manurônico (George e Abraham, 2006). Este polissacarídeo tem sido utilizado como veículo para a liberação de fármacos e proteínas, juntamente com a quitosana, complexo quitosana-alginato. O complexo quitosana-alginato é formado por interações iônicas entre os grupos carboxílicos do alginato e os grupos amino da quitosana (Tapia et al., 2004). A elevada solubilidade da quitosana é minimizada na presença de alginato, pois este biopolímero é insolúvel em pH ácido e em pH alcalino é facilmente solubilizado, o que não é observado para a quitosana. Deste modo, o complexo polieletrólítico quitosana-alginato pode ser utilizado em uma ampla faixa de pH (George e Abraham, 2006).

No intuito de aumentar a estabilidade química e física dos hidrogéis de quitosana e de complexos polieletrólíticos, diversas alternativas têm sido utilizadas. Dentre elas, a modificação química do hidrogel empregando agentes bifuncionais é a mais utilizada (Li e Bai, 2005; de Oliveira et al., 2006; Mendes et al., 2006; Altun e Cetinus, 2007). Esta modificação apresenta diversas vantagens, vantagens estas estudadas no presente trabalho, objetivando aumentar o grau de hidrofobicidade de complexos polieletrólíticos para a imobilização de lipases para posterior aplicação em meio orgânico.

2.3.4.2. Modificações Químicas na Estrutura da Quitosana

Diferentes métodos de tratamento são utilizados para modificar quimicamente a quitosana e um dos principais métodos é a reticulação. Este processo tem como objetivo melhorar a resistência mecânica, alterar a hidrofobicidade, biocompatibilidade e estabilidade química para diversas finalidades (Li e Bai, 2005; Mendes et al., 2006).

A modificação da estrutura química da quitosana é necessária para a obtenção de quitosana quimicamente mais resistente ao meio ácido e redução da capacidade de retenção de água. As principais reações envolvidas por meio dos grupos amino ou as hidroxilas da quitosana são aquelas que empregam agentes bifuncionais. Esta reação pode ser realizada homogeneamente, adicionando-se o agente bifuncional à solução de quitosana, ou heterogeneamente, com a adição do agente à quitosana nas formas de membranas e esferas (Monteiro e Airoidi, 1999; Desai et al., 2006).

Esta modificação pode ser realizada com diferentes espécies químicas, tais como epicloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído e outros, formando uma estrutura bastante complexa, estruturas estas relatadas na literatura (Li e Bai, 2005; de Oliveira et al., 2006; Mendes et al., 2006; Altun e Cetinus, 2007). A Figura 2.6 mostra uma representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído (A) e epicloridrina (B). A reação ocorre por meio do ataque nucleofílico dos grupos amino da quitosana ao grupo carbonila do glutaraldeído, também observado quando se utiliza glioxal e formaldeído (Altun e Cetinus, 2007). A reação da epicloridrina (1-cloro-2,3-epóxiopropano) ocorre nos grupos hidroxila da quitosana com a clivagem da ligação epóxido presente na estrutura da epicloridrina e liberação de um átomo de cloro (Fangkwangwong et al., 2006).

A ligação covalente entre os grupos amino e aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a valores extremos de pH e temperatura. Diferentes mecanismos são propostos para explicar a reação de glutaraldeído com a quitosana. Monteiro e Airoidi (1999) propuseram o mecanismo como sendo uma interação dos grupos amino livres da quitosana com o grupo aldeído do glutaraldeído formando Base de Schiff (ligação imina). Reações paralelas podem ocorrer entre quitosana e o glutaraldeído. Para interpretar este comportamento, três hipóteses são consideradas: (i) formação de uma base de Schiff entre o grupo aldeído com o grupo amino da quitosana. O outro grupo aldeído livre seria utilizado para a uma determinada reação de interesse (grupo reativo); (ii) a reticulação é formada entre uma molécula de glutaraldeído e duas unidades de grupo amino, resultando na formação de duas bases de Schiff e (iii) a reticulação é formada também por mais de uma molécula de glutaraldeído, devido à sua polimerização em determinadas condições, por exemplo, em altos valores de pH. Após a polimerização, ocorre a reticulação dos grupos amino da quitosana.

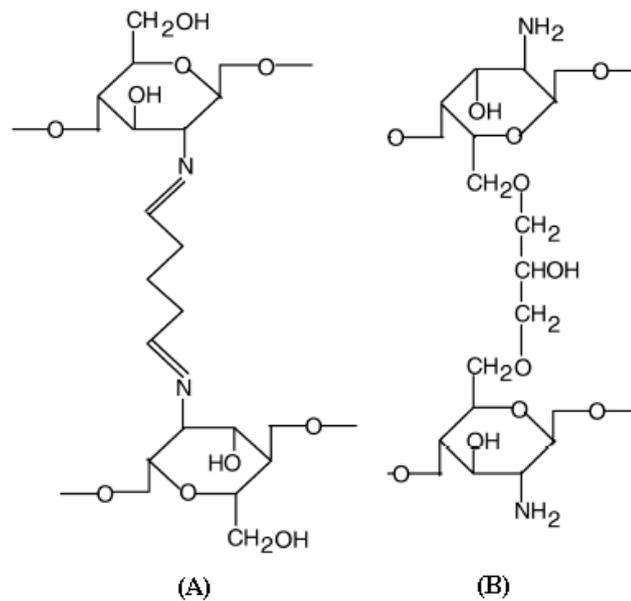


Figura 2.6. Estrutura química de quitosana reticulada com glutaraldeído (A) e epícloridrina (B).

O mecanismo de reação da epícloridrina com quitosana também é bastante similar ao glutaraldeído, no entanto, este agente de reticulação reage preferencialmente com os grupos hidroxilas da quitosana (Fangkangwanwong et al., 2006). Estas reações podem ser efetuadas entre grupos hidroxilas de duas moléculas de quitosana (reticulação intermolecular) ou reagir somente com um grupo hidroxila e o grupo epóxido livre seria utilizado para a uma determinada reação de interesse (grupo reativo).

É importante caracterizar as condições de reticulação porque a eficiência desta reticulação é diretamente proporcional às variáveis: concentração e tipo de agente de reticulação, tempo de contato, temperatura, pH, massa molecular da quitosana e o seu grau de desacetilação (Berger et al., 2004). O tempo de contato e a concentração de agente de reticulação são importantes para a determinação da natureza da estrutura produzida porque o aumento do tempo de reação e o uso de altas concentrações geram extensas reticulações. O grau de desacetilação e a massa molecular são importantes parâmetros porque os aumentos da massa molecular e do grau de desacetilação também resultam em um maior rendimento de reticulação. Este efeito também pode prejudicar a difusão de macromoléculas como proteínas nos interstícios do hidrogel devido à formação de poros de pequenos diâmetros (Gupta e Jabrail, 2006). O processo de reticulação reduz reações paralelas sobre a estrutura da quitosana como, por exemplo, a reação de ruptura do anel glicosídico por ação de agentes

oxidantes como o íon periodato (Vold e Christensen, 2005). Os grupos amino acetilados da quitosana impedem a reação de clivagem do biopolímero, reduzindo a solubilidade do hidrogel. Em suma, a reação de reticulação é importante porque impede a ruptura na molécula da quitosana permitindo a obtenção de um hidrogel mais estável física e quimicamente.

Os hidrogéis formados por quitosana e os complexos polieletrólíticos reticulados, como discutidos anteriormente, são caracterizados por serem moléculas estáveis, devido às ligações covalentes serem irreversíveis. Eles exibem maior resistência mecânica por redução de efeito de dissolução em extremas condições de pH, comportamento este não observado para hidrogéis sem reticulação. Entretanto, muito dos agentes de reticulação utilizados são prejudiciais à saúde, devido à sua alta toxicidade. Os hidrogéis formados por reticulação devem ser isentos de agentes de reticulação não reagidos e requerem diversas etapas de lavagem. Por exemplo, glutaraldeído é um composto neurotóxico e o glioxal é um agente mutagênico. Outro agente de reticulação bastante utilizado é o ácido oxálico, mas estudos mostram toxicidade em ratos (Berger et al., 2004). Novos agentes de reticulação vêm sendo utilizados na síntese de hidrogéis com melhores propriedades, dentre eles a genipina. Este composto é um agente bifuncional extraído do jenipapo e é bastante utilizado na medicina chinesa e também como corante de alimentos. Estudos mostram a sua biocompatibilidade com o organismo humano e ratos (Mi et al., 2002).

Mesmo com estas desvantagens, alguns trabalhos mostram a aplicação de hidrogéis reticulados com glutaraldeído e epícloridrina na síntese de biossensores (de Oliveira et al., 2006) e na produção de blendas que podem ser utilizadas como bandagem na regeneração de tecido epitelial e liberação controlada de fármacos em ambientes ácidos (Berger et al., 2004). Os hidrogéis sem reticulação não possuem toxicidade, ideais para estas finalidades, mas a sua baixa estabilidade restringe em algumas vezes a sua aplicação. A utilização de hidrogéis reticulados como suporte de imobilização de lipases para processos de biotransformação de óleos e gorduras é uma importante alternativa porque as reações de biotransformação são realizadas em meio aquo-restrito e o controle de água no gel é um importante parâmetro para esta finalidade. A aplicação destes hidrogéis como suporte para a imobilização de enzimas vem sendo desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Enzimática da Universidade Federal de São Carlos como suporte alternativo aos disponíveis comercialmente como agarose e resinas epóxi (Mendes et al., 2006; Rodrigues et al., 2008;

Adriano et al., 2008). O seu custo reduzido e a disponibilidade de seus grupos funcionais tornam a quitosana um suporte promissor para a imobilização de enzimas.

2.3.5. Agarose

A agarose é uma mistura de moléculas de ágar com um conteúdo menor de cargas e, portanto com maior capacidade de gelificação e com as seguintes propriedades: *(i)* pouca quantidade de grupos eletronegativos (fundamentalmente sulfatos e ácido pirúvico) resultando num polissacarídeo bastante inerte e adequado para técnicas cromatográficas; *(ii)* fácil dissolução aquosa; *(iii)* excelente transparência óptica tanto nas regiões de espectro visível quanto na região do ultravioleta, que permite uma melhor quantificação por técnicas espectrofotométricas; *(iv)* estrutura macroporosa, na qual é possível variar o tamanho do poro; *(v)* fácil ativação e derivatização do suporte e *(vi)* ausência de toxicidade (Mateo et al., 2006). A agarose é um biopolímero bastante utilizado na separação de moléculas de ácidos nucleicos de diferentes tamanhos (Adkins et al., 2006). A eletroforese em gel de agarose é uma das ferramentas mais utilizadas para a verificação da qualidade (pureza e quantidade) de DNA ou RNA de uma amostra, assim como para a purificação destes ácidos nucleicos. Nesta, o DNA de interesse é separado dos demais contaminantes (outras moléculas de DNA de diferente tamanho). A baixa resistência a altas temperaturas pode ser superada pelo entrecruzamento entre as moléculas do polímero com epícloridrina. Altos graus de entrecruzamento implicam maior resistência mecânica e redução do tamanho dos poros. É um dos suportes mais utilizados na imobilização de enzimas. Diversas publicações relatadas na literatura mostram a aplicação deste suporte para a imobilização multipontual de enzimas de diversas procedências (Guisán, 1988; Blanco e Guisán, 1988; Alvaro et al., 1990; Fernández-Lafuente et al., 1995; Tardioli et al., 2003a,b; Palomo et al., 2004; Mateo et al., 2006; Mendes et al., 2008a,b,c; Rodrigues et al., 2008; Fernández-Lorente et al., 2008).

2.4. Protocolos de Imobilização de Enzimas

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante para proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade de enzimas na presença de solventes orgânicos. Na literatura, muitos métodos são descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (Villeneuve et al., 2000; Dalla-Vecchia et al., 2004). Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Lipases têm sido imobilizadas em diferentes suportes de natureza orgânica e inorgânica empregando diferentes métodos de imobilização tais como adsorção física ou hidrofóbica, confinamento em matrizes poliméricas ou encapsulação em membranas poliméricas, ligação covalente pelo uso de agentes multifuncionais ou por reticulação (Dalla-Vecchia et al., 2004). No presente trabalho, os métodos de adsorção hidrofóbica e ligação covalente foram empregados na imobilização de lipases e as principais características destes métodos são relatadas.

2.4.1. Imobilização por Adsorção Física

Nas reações conduzidas em meio orgânico não são requeridas fortes interações entre a enzima e o suporte (Secundo et al., 2008). Nestas condições, a enzima é insolúvel no meio apolar e a adsorção física pode ser um método bastante vantajoso (Secundo et al., 2008). Este método de imobilização é de baixo custo, pois não é necessária a ativação do suporte e permite fácil reuso do suporte após vários ciclos (Secundo et al., 2008).

A imobilização de lipases por adsorção física é normalmente realizada em suportes hidrofóbicos devido ao seu caráter hidrofóbico, como mostrado na Figura 2.7 (Mateo et al., 2007b). Esta enzima sofre ativação interfacial na presença de interface hidrofóbica e a região do sítio ativo interage por adsorção hidrofóbica com o suporte. Lipases possuem uma cadeia polipeptídica chamada de “*lid*” ou tampa hidrofóbica que cobre seu sítio ativo e em meio aquoso o seu sítio ativo é inacessível ao substrato (conformação fechada) (Verger, 1997;

Bastida et al., 1998; Palomo et al., 2002; Palomo et al., 2003). Na presença de uma superfície hidrofóbica, o equilíbrio é deslocado para a conformação aberta. Neste caso, a lipase é fortemente adsorvida à matriz hidrofóbica e reconhece esta matriz similarmente aos seus substratos naturais (gota de óleo) immobilizando a enzima sob a conformação aberta.

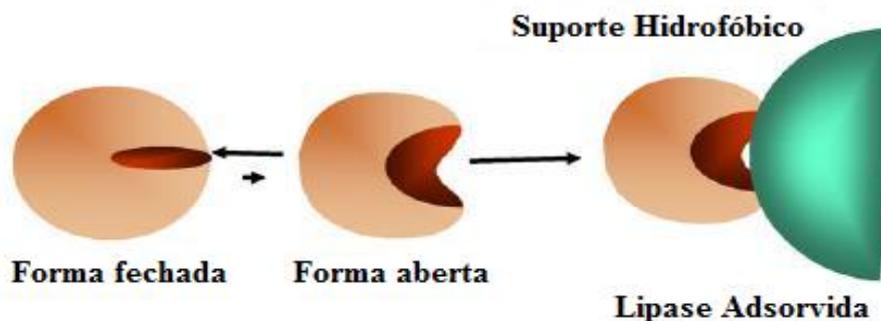


Figura 2.7. Imobilização de lipases por adsorção física em suportes hidrofóbicos. Fonte: Mateo et al. (2007b).

Lipases imobilizadas em matrizes hidrofóbicas são disponíveis comercialmente e normalmente em matrizes orgânicas. Dentre estes derivados destacam-se a lipase de *Candida antarctica* tipo B (CALB) imobilizada em resina poliacrílica com o nome comercial de Novozym 435, o biocatalisador mais empregado em reações de biotransformação de lipases em meios aquo-restritos, lipase de *Mucor miehei* imobilizada em resina de troca aniônica macroporosa (Lipozyme-IM) comercializada pela Novozymes e a empresa Roche também comercializa esta preparação de lipase com o nome comercial de Chirazyme (Christensen et al., 2003). Entretanto, estes biocatalisadores são de alto custo, associado ao preço das matrizes hidrofóbicas. O uso de matrizes de baixo custo para a imobilização de lipases tem sido extensivamente empregado e demonstra ser uma alternativa bastante promissora na inserção de lipases em processos em escala industrial. Suportes hidrofóbicos mais utilizados em imobilização de lipases são casca de ovo (Vemuri et al., 1998), filossilicatos (Iso et al., 2001), bentonita (Yesiloglu, 2005) e polipropileno (Bosley e Peilow, 1997). Outros suportes hidrofóbicos de baixo custo como poli-(hidróxi-butilato) tem apresentado resultados promissores em reações de biotransformação em meio aquo-restrito na síntese de biodiesel (Mendes et al., 2008d).

2.4.2. Imobilização Covalente Multipontual de Enzimas em Geis Glioxil

A imobilização covalente multipontual em glioxil-suporte consiste na formação de várias ligações covalentes entre grupos aminos desprotonados de resíduos de lisina de uma molécula de enzima, como amins desprotonadas de resíduos lisina, grupos carboxílicos e grupos aldeídos alifáticos lineares moderadamente afastados da superfície do suporte (grupos glioxil), como ilustrado na Figura 2.8.

Segundo Guisán (1988) a utilização de géis glioxil-agarose possibilita uma intensa multi-interação enzima-suporte, sem distorção da estrutura da enzima, devido à ausência de impedimentos estéricos para a reação química amino-aldeído. Desta forma, as bases instáveis de Schiff, por redução com borohidreto de sódio são convertidas em amins secundárias estáveis, produzindo-se derivados com alta retenção de atividade, alta rigidez e, por conseguinte, alta estabilidade térmica.

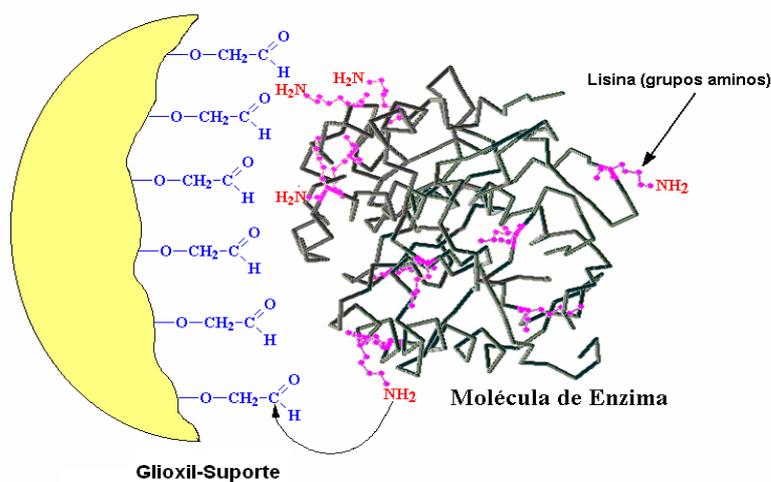


Figura 2.8. Esquema representativo de imobilização de enzimas em suportes glioxil.

A Tabela 2.3 apresenta a atividade recuperada e o fator de estabilidade de diversas enzimas imobilizadas em gel glioxil-agarose (Mateo et al., 2006). A atividade recuperada variou entre 60 a 100% e a estabilização, de acordo com o tempo de meia-vida do biocatalisador, em muitos casos foi 1000 a 100000 vezes mais estável que a enzima imobilizada unipontualmente.

Tabela 2.3. Atividade recuperada e fator de estabilidade para diversas enzimas imobilizadas multipontualmente em glioxil-agarose.

Enzimas (fontes)	AR (%)	FE
Tripsina	75	10000 ^a
Quimotripsina	70	60000 ^a
Penicilina G acilase (<i>E. coli</i>)	70	8000 ^a
Penicilina G acilase (<i>K. citrophila</i>)	70	7000 ^a
Ferredoxina NADP redutase (<i>Anabaema</i> sp.)	60	1000 ^a
Lipase (<i>C. rugosa</i>)	50	150 ^a
Lipase (<i>B. thermocatenulatus</i>)	75	500 ^a
Esterase (<i>B. stearotheophilus</i>)	70	1000 ^a
Termolisina (<i>B. thermoproteolyticus</i>)	100	100 ^a
Glutamato racemase	70	1000 ^a
Alcalase	54	500
Uroquinase	80	10

AR: Atividade recuperada (%); FE: Fator de Estabilidade (relação entre os tempos de meia-vida da enzima imobilizada e a enzima solúvel).

a: comparada com enzimas imobilizadas unipontualmente.

Fonte: Mateo et al. (2006).

2.4.2.1. Principais Fatores que Interferem na Imobilização Multipontual de Enzimas

(a) Efeito do Suporte

Um parâmetro bastante relevante à possibilidade de interação multipontual enzima-suporte é o grau de ativação do suporte, ou seja, a densidade de grupos reativos (aldeído) na superfície do suporte. No caso específico da agarose, o número de grupos aldeídos por unidade de massa ou volume de suporte, depende da porcentagem de agarose usada na preparação das partículas (Mateo et al., 2006). Elevada porcentagem de agarose presente nas partículas é responsável pela formação de suporte com elevada porosidade porque o número de entrelaçados entre as fibras é maior, sendo mais favorável para uma efetiva imobilização de enzimas pela técnica multipontual. Para cada mL de gel de agarose 10% reticulado pode ser imobilizado aproximadamente 100-120 mg de uma enzima de baixa-média massa molecular, como penicilina G acilase, e o suporte pode ser ativado com uma concentração de 220 μmoles de grupos glioxil.mL⁻¹ de suporte. Empregando gel de agarose

4% de reticulação, o carregamento máximo de proteína é de 20-30 mg.mL⁻¹ e a ativação máxima é de 40 μmoles de grupos glioxil.mL⁻¹ de suporte. Entretanto, a densidade superficial de grupos glioxil na superfície do gel de agarose é de aproximadamente 17 grupos/ 1000Å (Guisán, 1988).

Além disso, a estabilidade da enzima imobilizada aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de agarose. Para agarose a 10%, o fator de estabilidade é 10 vezes superior ao da agarose com 4% de reticulação, dependendo do tamanho da enzima utilizada. A razão é a geometria da enzima, pois quanto maior é o tamanho da enzima, maior será o contato com os grupos reativos do suporte e assim a multi-interação do sistema enzima-suporte é mais efetiva conferindo maior número de ligações e menor mobilidade da enzima, reduzindo a inativação (Mateo et al., 2006).

O controle da ativação do suporte permite controlar a intensidade das reações da enzima com o suporte e é possível também reduzir o grau de ativação para níveis desejados, pois elevada ativação pode acarretar distorção da enzima na imobilização. O controle é muito simples porque a oxidação do gliceril suporte com periodato de sódio é uma reação estequiométrica. O decréscimo da concentração de grupos aldeído no suporte promove uma redução da estabilidade do derivado e na velocidade de imobilização (Blanco e Guisán, 1988). Se a concentração de grupos glioxil é baixa, o rendimento de imobilização também será baixo e, portanto, o período de contato da enzima com o suporte deve ser prolongado para a obtenção de derivados mais estáveis. Para tempos de imobilização curtos, a estabilidade da enzima imobilizada terá um comportamento similar à da enzima solúvel.

(b) Efeito das Condições de Imobilização

O processo de imobilização multipontual requer temperatura ambiente (20-25 °C) e elevado valor de pH, cerca de pH 10,0 para possibilitar que os grupos lisina da enzima encontram-se desprotonados para se ligar efetivamente com os grupos aldeído do suporte (Blanco e Guisán, 1988). Um outro fator importante no processo de imobilização multipontual é o tempo de contato da enzima com o suporte. Imobilização em pH alcalino e com suporte altamente ativado pode ser extremamente rápido, podendo atingir curtos períodos

de imobilização, na ordem de minutos. Neste curto período de contato da enzima com o suporte, pelo menos 2 ligações podem ter sido efetuadas, mas a estabilização das ligações entre enzima e o suporte leva um tempo maior para a sua estabilização completa.

O tampão a ser empregado também é um outro fator bastante importante no processo de imobilização. É necessária a utilização de uma solução-tampão capaz de facilitar a interação dos grupos lisina da enzima com os grupos glioxil do suporte e o tampão mais utilizado neste processo é o tampão bicarbonato (Guisán, 1988). Estudos relatados na literatura mostram que a imobilização de enzimas na presença de tampão borato atingiu níveis poucos satisfatórios de fixação da enzima penicilina G acilase de *E. coli* em glioxil-agarose devido à formação de complexos com os grupos aldeído (Álvaro et al., 1990). A utilização de tampão de compostos aminados, como as soluções de tampão tris-HCl, etilenodiamina e etanolamina também reduziram a eficiência de imobilização devido à competição entre os grupos amino da enzima e do tampão, obtendo-se derivados imobilizados com baixa estabilidade térmica (Fernández-Lafuente et al., 1995).

(c) Efeito da Modificação Química de Enzimas

Recentemente, foi demonstrado que o enriquecimento de grupos reativos na superfície da proteína por tecnologia do DNA recombinante ou rotas químicas permite aumentar consideravelmente a estabilização térmica de enzimas imobilizadas multipontualmente (Lopez-Gallego et al., 2005; Fernández-Lorente et al., 2008). Entretanto, estas técnicas não influenciam na estabilização da enzima solúvel. A modificação química da superfície da proteína tem sido utilizada na estabilização de derivados imobilizados por ligação covalente multipontual (Lopez-Gallego et al., 2005; Fernández-Lorente et al., 2008). Uma das técnicas de modificação química empregada é a modificação dos grupos carboxílicos presentes na superfície da enzima pela reação com etilenodiamina (EDA) catalisada por N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodi-imida (EDAC), de acordo com a reação mostrada na Figura 2.9 (Lopez-Gallego et al., 2005).

Na imobilização covalente multipontual, os resíduos lisina desprotonados atacam nucleofílicamente os grupos glioxil do suporte. A modificação química da enzima

permite maior interação da proteína com o suporte, o que influencia na estabilização térmica dos derivados. O valor de pKa dos novos grupos amino introduzidos é de 9,0, e o valor de pKa dos grupos amino da lisina, presente naturalmente na superfície da enzima é de 10,5. O processo de aminação permite imobilizar enzimas multipontualmente em condições mais brandas de pH (Lopez-Gallego et al., 2005). De acordo com Lopez-Gallego et al. (2005), enzimas aminadas quimicamente são imobilizadas multipontualmente em pH 9,0, enquanto enzimas não-modificadas só podem ser imobilizadas em pH acima de 10,05.

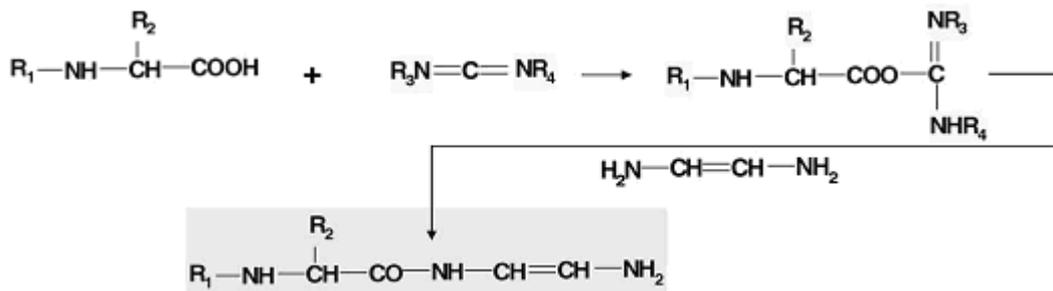


Figura 2.9. Mecanismo de aminação dos grupos carboxílicos da lipase ativados com EDAC na presença de EDA.

Fonte: Lopez-Gallego et al. 2005).

2.4.3. Imobilização Multipontual de Enzimas em Suportes Epóxi

Os protocolos de imobilização de enzimas em resinas epóxi são bastante simples. Estas resinas são muito estáveis em pH neutro, mesmo em condições úmidas e podem ser armazenados por um longo período. Além disso, estes suportes podem estabilizar a enzima por ligação covalente multipontual, conferindo alta estabilização aos derivados. Além disso, enquanto outros protocolos de imobilização promovem grandes alterações na superfície da proteína, a imobilização em suportes epóxi permite pequena modificação química da proteína. Os grupos epóxi sofrem ataque nucleofílico de diferentes grupos da superfície da enzima como, amino, tiol e hidróxi, permitindo intensas interações entre a enzima e o suporte.

No entanto, os grupos epóxi são fracamente reativos sob condições suaves como pH neutro e baixa força iônica (Mateo et al., 2003; Grazú et al., 2003; Mateo et al., 2007). Assim, a imobilização empregando esse tipo de suporte deve ser realizada em duas

etapas: na primeira, a enzima é adsorvida sobre a superfície do suporte. Por esta razão, a maioria dos suportes comerciais projetados para a imobilização de enzimas via epóxi deve ter um caráter altamente hidrofóbico. Alta força iônica é requerida nesta etapa para forçar a adsorção hidrofóbica das proteínas sobre o suporte (Mateo et al., 2000). Na segunda etapa, a proteína previamente adsorvida é ligada covalentemente aos grupos epóxi do suporte. Após um longo tempo de incubação da enzima adsorvida em pH 7,0, o derivado é incubado em pH alcalino (10,05) para efetuar multi-interações entre a enzima e o suporte, conferindo maior rigidez ao derivado e, assim, possibilitando obter derivados com elevada estabilidade térmica (etapa de estabilização da enzima). A proximidade da enzima com o suporte favorece a maior rigidificação da enzima, pois os suportes epóxi apresentam pequenos braços espaçadores. O esquema representativo de imobilização de enzimas em resinas epóxi é representado na Figura 2.10 (Mateo et al., 2000).

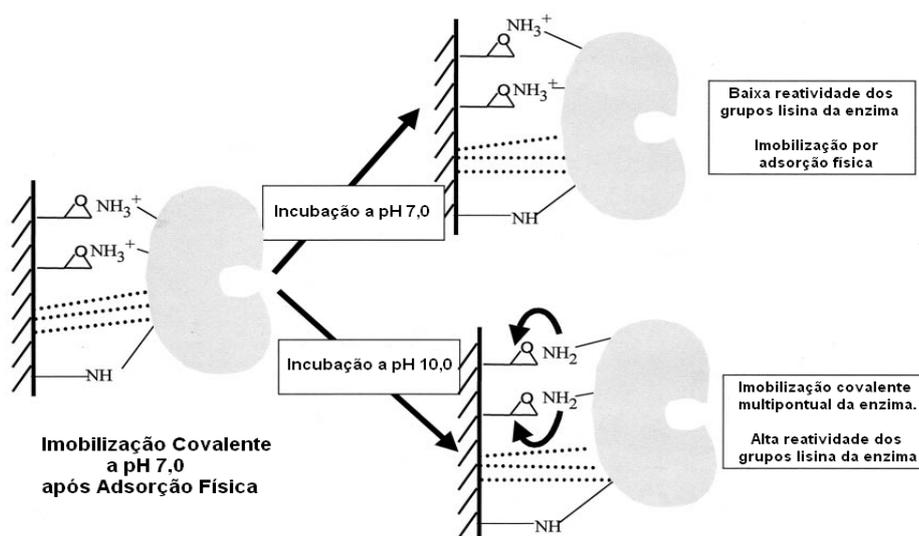


Figura 2.10. Esquema representativo de imobilização de enzimas em suportes epóxi.
Fonte: Mateo et al. (2000).

Devido a estas características, estes suportes têm sido extensivamente empregados para a estabilização de enzimas via ligação covalente multipontual (Mateo et al., 2000; Mateo et al., 2002; Mateo et al., 2003; Grazú et al., 2003; Mateo et al., 2007). Em geral, a imobilização de enzimas em suportes epóxi deve apresentar dois tipos de grupos funcionais para promover (i) adsorção física de proteínas e (ii) grupos capazes de imobilizar covalentemente a enzima (grupos epóxi).

Os grupos epóxi são susceptíveis à modificação química com inserção de outros grupos funcionais na obtenção de suportes heterofuncionais que possam melhorar as propriedades químicas do suporte em relação à sua forma monofuncional (grupos epóxi). Estes suportes heterofuncionais são disponíveis comercialmente ou podem ser produzidos em escala laboratorial. Epóxi-amino-Sepabeads, comercializado pela Mitsubishi Chemical Corp., é um suporte heterofuncional no qual alguns grupos epóxi foram modificados quimicamente com etilenodiamina (Torres et al., 2003). Tiol-epóxi-Sepabeads, um outro suporte heterofuncional, pode ser sintetizado a partir da inserção de grupos sulfidrila por compostos tiolados como ditiotreitól, ligando-se a enzima por pontes de dissulfeto com resíduos cisteína presentes na superfície da enzima (Grazú et al., 2003; Mateo et al., 2007a,b). A adoção de suportes heterofuncionais permite que outros grupos reativos do suporte possam interagir com a enzima. Permite ainda uma maior velocidade de adsorção da enzima, reduzindo o tempo de imobilização, não sendo necessária a utilização de suportes altamente hidrofóbicos para forçar a adsorção física da enzima (Torres et al., 2003; Mateo et al., 2003; Mateo et al., 2007a,b). Outra vantagem na utilização desses suportes é que pode ser empregada solução de baixa força iônica na etapa de adsorção física. A imobilização de enzimas sobre matrizes heterofuncionais não ocorre em elevada força iônica, enquanto que em epóxi-Sepabeads monofuncional requer no mínimo força iônica de 250 mM. Diferentes enzimas têm sido imobilizadas em Sepabeads nas formas mono e heterofuncional e os parâmetros cinéticos dos derivados estão sumarizados na Tabela 2.4 (Mateo et al., 2003).

Tabela 2.4. Parâmetros de imobilização de enzimas em Sepabeads monofuncional (epóxi) e heterofuncional (epóxi-amino).

Enzimas (fontes)	Suportes			
	Epóxi-Sepabeads		Epóxi-amino-Sepabeads	
	AR (%)	RI (%)	AR (%)	RI (%)
β -galactosidase (<i>A. oryzae</i>)	15	36	100	100
β -galactosidase (<i>Thermus</i> sp.)	50	58	100	100
Invertase (fermento de pão)	90	60	70	100
Glucoamilase (<i>A. niger</i>)	87	85	75	100
Lipase (<i>C. rugosa</i>)	5	85	65	88
Glutaril acilase	100	75	100	100

AR: Atividade recuperada (%) e RI: Rendimento de imobilização.

A imobilização das enzimas foi realizada em tampão fosfato pH 7,0 a 20 °C por 24 h em força iônica de 5 mM (suporte heterofuncional) e 1 M (suporte monofuncional).

Fonte: Mateo et al. (2003).

Verifica-se na Tabela 2.4, que as enzimas imobilizadas em epóxi-amino-Sepabeads apresentaram rendimento de imobilização bastante superior aos derivados imobilizados em epóxi-sepabeads. A atividade recuperada também foi influenciada pela natureza do suporte, principalmente para a lipase de *Candida rugosa*, mostrando que a utilização de suportes heterofuncionais permite obter derivados mais ativos.

2.5. Biocatálise em Meios Não-Convencionais

A bioconversão inclui a seleção de um meio reacional, que pode ser um meio convencional (meio aquoso) ou meios não-convencionais. Entretanto, o uso de água como solvente em reações de biotransformação restringe a uma gama de aplicações da biocatálise, bem como limitada produtividade de diversos processos, principalmente os que envolvem substratos hidrofóbicos. Por outro lado, a constatação de que muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes hidrofóbicos, levou à conclusão de que estes meios predominantemente não-aquosos são igualmente adequados à expressão de atividade biocatalítica (Aires-Barros, 2002).

A principal razão para a utilização de meios não-convencionais é a possibilidade de solubilizar substratos e/ou produtos hidrofóbicos, levando ao desenvolvimento de processos com produtividade volumétrica elevada; a redução de possíveis efeitos inibitórios e/ou tóxicos pelo substrato e/ou produto. A seleção de solventes orgânicos (caso presente no meio reacional) deve ser efetuada modo a permitir que o solvente atue como diluente, reduzindo a concentração interfacial e na fase aquosa (por partição) de substratos e/ou produtos e o deslocamento do equilíbrio químico, sem interferir negativamente na atividade catalítica da enzima (Aires-Barros, 2002).

Os meios não-convencionais para biocatálise podem ser solventes orgânicos, fluidos supercríticos e líquidos iônicos (Aires-Barros, 2002). Por outro lado, estes sistemas também apresentam algumas desvantagens como: desnaturação e/ou inibição do catalisador na presença de solvente orgânico, aumento da complexidade do sistema de reação e o aumento de custos adicionais com os solventes e tensoativos.

O uso de biocatalisadores em meios não-convencionais tende a aumentar a estabilidade da enzima (Klibanov, 2001; Mendes et al., 2007). A inativação térmica de enzimas ocorre por dois mecanismos de inativação: o primeiro é tempo-dependente, gradual e irreversível (perda de atividade enzimática sobre a exposição em temperaturas elevadas) e o segundo é induzido por calor, com desdobramento, geralmente quase instantâneo e reversível da molécula de enzima (Klibanov, 2001). A água influencia diretamente na mobilidade conformacional das enzimas e também em reações de desaminação de resíduos asparagina/glutamina e na hidrólise de ligações peptídicas (proteólise) (Klibanov, 2001). Por isso é que as enzimas são mais termoestáveis quando incubadas em meios orgânicos.

A estabilidade mais elevada de enzimas em meios aquo-restritos é bastante documentada (Volkin et al., 1991; Klibanov, 2001). Por exemplo, lipase, ribonuclease e quimotripsina de pâncreas de porco a 100 °C, apresentaram tempo de meia-vida de várias horas em condições anidras enquanto que em meio aquoso estas enzimas foram totalmente inativadas em segundos quando expostas à mesma temperatura (Klibanov, 2001). A temperatura de desdobramento térmico (fusão da enzima) de ribonuclease de pâncreas de porco suspensa em nonano é de 124 °C, enquanto em água é de apenas 61 °C (Volkin et al., 1991). A resistência térmica de desdobramento diminui à medida que reduz a concentração de água. A enzima não interage com o solvente orgânico, o que permite maior rigidez à estrutura conformacional e reduzindo, assim, a inativação da enzima. Em solução aquosa, normalmente ocorre contaminação microbiana que pode produzir enzimas proteolíticas que são responsáveis pela hidrólise de enzimas (proteólise). Em meio orgânico, estas enzimas proteolíticas são insolúveis e, portanto, não podem interagir com a enzima de interesse.

O desenvolvimento da catálise em meio orgânico evidenciou que a quantidade de água realmente necessária para propiciar a atividade enzimática é muito pequena. Portanto, a existência de uma fase aquosa definida, mesmo que em pequena proporção, não é um pré-requisito para a eficiência da catálise, ou seja, a concentração de água requerida é somente para a atividade catalítica da enzima (Dalla-Vecchia et al., 2004). Sendo assim, seria tecnologicamente mais atrativo dispensar o uso de solventes orgânicos e realizar a reação enzimática apenas com a mistura dos materiais de partida. Esta possibilidade, se viável, combina a precisão da catálise biológica com os altos níveis de produtividade alcançados nos melhores métodos convencionais. Entre algumas das vantagens deste sistema cita-se a ausência de toxicidade e de inflamabilidade dos solventes orgânicos, redução do custo inicial

do produto e fácil recuperação do produto sem as etapas de purificação ou evaporação (Selmi et al., 1997). Geralmente, pode-se prever algumas dificuldades imediatas para a implementação de um sistema isento de solvente, como a minimização de transferência de massa; homogeneidade do meio reacional; a mistura reacional deve ser e permanecer líquida durante o processo e devem ser adotadas estratégias que desloquem o equilíbrio no sentido da síntese.

2.6. Síntese de Biodiesel a partir de Óleos e Gorduras

O esgotamento dos recursos fósseis e a crescente conscientização ecológica da sociedade têm conduzido à procura de combustíveis a partir de fontes renováveis como a biomassa vegetal. Também outras fontes alternativas de energia como solar, eólica e energia obtida por clivagem de radioisótopos tem sido intensamente estudadas (Antczak et al., 2009). Todas estas fontes de energia renováveis contribuem para a redução da emissão de dióxido de carbono no ar atmosférico.

Óleos vegetais foram utilizados como combustível em automóveis no início do século 19 por Rudolph Diesel (Akoh et al., 2007; Antczak et al., 2009). No entanto, a utilização direta de óleos vegetais como combustível é insatisfatória e impraticável para uso em longo prazo devido à alta viscosidade e formação de ácidos graxos livres que resultam na formação de goma de oxidação, polimerização e deposição de carbono (Ranganathan et al., 2008).

Os óleos vegetais são processados de modo a adquirir propriedades tais como viscosidade semelhante aos combustíveis fósseis e os principais métodos empregados são a pirólise, micro-emulsificação e transesterificação. Pirólise consiste na modificação química de óleos vegetais por craqueamento em altas temperaturas. Os óleos vegetais são craqueados para reduzir a viscosidade e melhorar o índice de cetano. Os produtos do craqueamento incluem alcanos, alcenos, e ácidos carboxílicos. Óleos de soja, algodão, colza e outros foram craqueados eficientemente com catalisadores químicos para a obtenção de um combustível de baixa viscosidade. As principais desvantagens deste processo incluem o alto custo dos equipamentos e a necessidade de separar por destilação os subprodutos formados.

Microemulsificação é outra técnica relatada para reduzir a viscosidade de óleos vegetais e os componentes desta micro-emulsão, incluem óleo diesel e outros derivados do petróleo, alcoóis e surfatante em proporções adequadas. Álcoois como metanol, propanol e etanol são utilizados como aditivos para a redução da viscosidade, álcoois superiores são utilizados como tensoativos e alquil nitratos são usados para aumentar o índice de cetano. Apesar da redução da viscosidade e aumento do índice de cetano, a utilização de micro-emulsões provoca alguns problemas como entupimento do injetor, depósito de carbono por combustão incompleta (Ma e Hanna, 1999).

O método tradicional de produção de energia a partir de óleos e gorduras é a transesterificação com alcoóis de cadeia curta e o produto obtido, uma mistura de mono-álquil ésteres, denominado biodiesel (Akoh et al., 2007; Ranganathan et al., 2008; Vasudesan e Briggs, 2008; Antczak et al., 2009).

Além dos óleos vegetais, o biodiesel também pode ser produzido a partir de outras fontes como gordura animal (sebo bovino, banha de porco), resíduos de óleos das indústrias de extração e restaurantes e óleo microalgal (Vasudesan e Briggs, 2008; Antczak et al., 2009). Este processo também é chamado de alcoólise que resulta na formação de uma mistura de mono-álquil ésteres e glicerol, como mostrado na Figura 2.11. Os mono-álquil ésteres formados apresentam propriedades similares ao diesel convencional e podem ser empregados eficientemente como substitutos dos combustíveis fósseis.

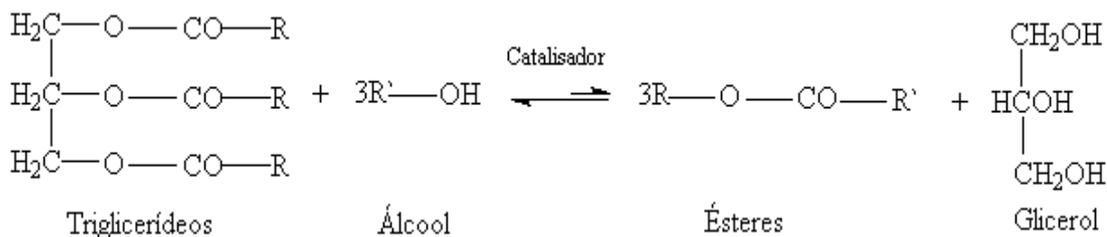


Figura 2.11. Equação geral de transesterificação de óleos e gorduras com alcoóis de cadeia curta na síntese de biodiesel.

Fonte: Da Rós, 2009.

No aspecto ambiental, as vantagens da utilização do biodiesel são muito significativas. O biodiesel apresenta baixa toxicidade, é biodegradável, não contém enxofre e compostos aromáticos e ainda reduz significativamente a emissão de gases, como o monóxido

e dióxido de carbono (Ranganathan et al., 2008; Vasudesan e Briggs, 2008). A ausência total de enxofre em sua composição química confere ao biodiesel uma grande vantagem, pois não há emissões de gases sulfurados (SOx), característicos em motores movidos a derivados de petróleo. Dessa forma, há uma contribuição efetiva para a minimização do fenômeno da chuva ácida. Além disso, diferentemente do combustível fóssil, o CO₂ liberado na queima do biodiesel é reciclado por absorção durante o crescimento da massa vegetal (fotossíntese). Assim, a produção do biodiesel está inserida em um processo cíclico que auxilia na minimização do efeito estufa, pois há um equilíbrio entre a massa de carbono fixada e aquela liberada. Combustíveis oriundos de fontes fósseis podem conter até 20% hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Para um equivalente número de átomos de carbono, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são até três vezes mais solúveis em água do que os de cadeia alifática. O fato de biodiesel não conter hidrocarbonetos aromáticos policíclicos o torna uma alternativa segura para armazenamento e transporte (Vasudesan e Briggs, 2008).

O biodiesel é misturado ao diesel convencional em proporções de 2% (B2), 5% (B5), ou 20% (B20) e também pode ser empregado puro (B100). Este biocombustível pode ser utilizado regularmente em veículos com motor diesel sem fazer quaisquer alterações nos motores (Ma e Hanna, 1999; Ranganathan et al., 2008). Também pode ser armazenado e transportado utilizando tanques e equipamentos similares ao diesel proveniente do petróleo. O biodiesel atua também como lubrificante e esta propriedade confere aumento na vida útil de motores de combustão. Muitos países vêm introduzindo o biodiesel em misturas com o diesel de petróleo para aumentar a lubricidade, pois o principal fator relacionado à lubricidade é o teor de enxofre presente no combustível. O maior ponto de fulgor do biodiesel torna um combustível mais seguro para usar, manusear e armazenar (Vasudesan e Briggs, 2008). O seu uso é ideal em ambientes sensíveis, tais como cidades fortemente poluídas pela emissão de CO₂ e outros gases.

Países como o Brasil, Estados Unidos e Europa incentivam a produção de biodiesel em larga escala, uma alternativa economicamente viável de substituição dos combustíveis fósseis, além de minimizar problemas ambientais. Porém, alguns países como Cuba e Venezuela questionam se o aumento da produção de biocombustíveis não deslocaria a produção de áreas cultiváveis para a produção de alimentos, aumentando problemas sociais como a fome em países pobres. Portanto, um dos grandes desafios dos processos de produção de biodiesel é a disposição de matérias-primas capazes de atender a demanda dos programas

energéticos sem impactar de forma significativa a produção de alimentos (Suarez et al, 2009). Há vários desafios técnicos que precisam ser avaliados para tornar o biodiesel uma fonte de energia rentável. Para reduzir o custo da produção e torná-lo competitivo como o diesel de petróleo, matérias-primas de baixo custo, tais como óleos não-comestíveis, resíduos de óleos e gorduras animais devem ser priorizados (Vasudesan e Briggs, 2008).

A soja, por exemplo, possui uma produtividade muito baixa em lipídeos, demandando enormes quantidades de terra para suprir o mercado de biocombustível. No entanto, a soja corresponde hoje a aproximadamente 90% da produção brasileira de óleos, o que faz com que seja a matéria-prima preferencial da indústria de biodiesel. No entanto, o aumento na demanda por óleos para a produção de biocombustíveis dificilmente poderá ser atendido pela soja ou outros cereais como milho ou canola, uma vez que demandaria uma larga extensão de terra agriculturável. Uma melhor produtividade em óleos pode ser alcançada com o uso de palmáceas, tais como óleos de palma, coco e babaçu, tidas por muitos especialistas em produção agrícola como as únicas viáveis hoje para atender programas de biodiesel em larga escala com baixo impacto na produção de alimentos (Suarez et al., 2009).

Outras oleaginosas que tem merecido destaque na produção de biodiesel são aquelas pertencentes à família *Jatropha*, especialmente do gênero *Curcas*, conhecido no Brasil como pinhão-manso. Esta planta, assim como outras espécies da família *Jatropha*, é ainda pouco cultivada no Brasil, mas pelo fato de ser perene e de se adaptar muito bem em regiões semi-áridas tem sido apontada como ideal para a produção de óleos no nordeste brasileiro, utilizando a agricultura familiar. Apesar de ser ainda bastante controversa a produtividade destas espécies devido ao pouco estudo em campo, vários pesquisadores garantem que podem ser obtidos por hectare até 2200 litros de óleo/ por ano (Suarez et al., 2009).

2.6.1. Transesterificação de Óleos e Gorduras

As reações de transesterificação podem ser realizadas por diferentes rotas, empregando diferentes catalisadores como álcalis, ácidos e enzimas, mais especificamente lipases (Ma e Hanna, 1999; Nassreddine et al., 2008). A via química utiliza preferencialmente

catalisadores alcalinos como os hidróxidos de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) e álcoois de cadeia curta como metanol e etanol (Ma e Hanna, 1999; Ranganathan et al., 2008; Chen et al., 2009). Inicialmente, durante o processo, o alcóxido é formado pela reação do catalisador com o álcool e este alcóxido reage com qualquer tipo de óleo vegetal ou gordura para formar biodiesel e glicerol. Glicerol, mais denso, deposita na parte inferior do reator por decantação e o biodiesel permanece na fase superior (Ranganathan et al., 2008). Este processo é o mais eficiente, o rendimento de reação de transesterificação é próximo a 99%, mesmo em baixas temperaturas, da ordem de 60 °C (Nassareddine et al., 2008). Apesar desta excelente produtividade, a produção global de biodiesel é relativamente limitada, principalmente devido a alguns inconvenientes como a necessidade de aplicação de óleos vegetais refinados, problemas relacionados com a recuperação de glicerol puro (o principal subproduto) e formação de sabões, mono- e diacilgliceróis, e pigmentos (Marchetti et al., 2007; Ranganathan et al., 2008; Antczak et al., 2009). Os resíduos de todos esses subprodutos podem agravar a qualidade do biodiesel. A purificação do produto transesterificado inclui etapas de neutralização do catalisador, desodorização e remoção de pigmentos formados com o aumento da temperatura, normalmente superiores a 60 °C (Ranganathan et al., 2008). Além disso, a concentração de ácidos graxos livres (AGL) nos óleos vegetais utilizados na produção de biodiesel tem que ser inferior a 0,5%, caso contrário, o rendimento de transesterificação é comprometido devido à formação de sabão que compromete a qualidade do produto final (Meher et al., 2006). Na via química, outra importante classe de catalisadores empregados na produção de biodiesel são os ácidos (Ma e Hanna, 1999; Meher et al., 2006; Vasudesan e Briggs, 2008). Qualquer ácido mineral pode ser empregado para catalisar o processo, porém, os mais comumente utilizados são os ácidos sulfúrico e sulfônico (Ma e Hanna, 1999; Meher et al., 2006; Marchetti et al., 2007). Apesar da elevada produtividade, os ácidos, altamente corrosivos, podem causar danos ao equipamento e a produtividade da reação é relativamente inferior aos catalisadores alcalinos (Ma e Hanna, 1999).

De todos os métodos acima mencionados para a produção de biodiesel, apenas o processo alcalino é realizada em um escala industrial por ser altamente eficiente e viável economicamente. Mas os problemas surgem em operações à jusante, incluindo a separação do catalisador e do álcool que não reagiu. A remoção do catalisador envolve muitas complicações e para a obtenção do biodiesel são requeridas repetidas lavagens para atingir o

grau de pureza necessário, como pode ser verificado na Figura 2.12A (Ranganathan et al., 2008).

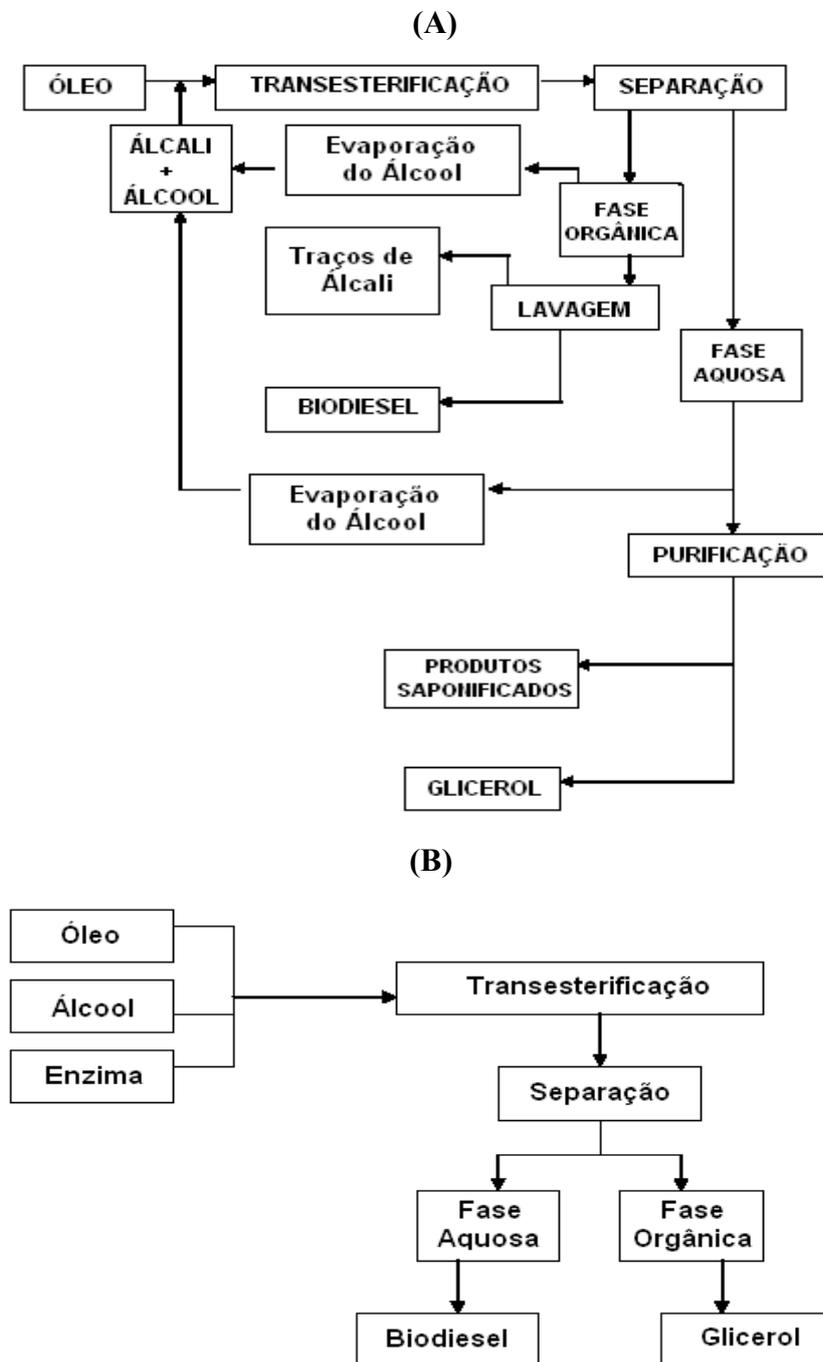


Figura 2.12. Produção de biodiesel por transesterificação alcalina (A) e enzimática (B) de óleos e gorduras.

Fonte: Ranganathan et al. (2008).

Na produção de biodiesel catalisada por enzimas, especificamente lipases, algumas das desvantagens acima referidas podem ser eliminadas e, portanto, processos enzimáticos são uma promissora alternativa à rota química (Figura 2.12B). Estas lipases são obtidas principalmente a partir de diferentes fontes, porém as lipase microbianas são mais empregadas devido aos baixos custos de produção e de fácil modificação das propriedades (de Castro et al., 2004). A síntese enzimática de biodiesel ocorre geralmente em temperaturas amenas, na faixa de 20 a 60 °C (Marchetti et al., 2007). Após o final do processo, a fase inferior (glicerol) é simplesmente separada da fase superior (biocombustível) por simples decantação e a desodorização e a neutralização do produto final não é necessária (Ranganathan et al., 2008).

Um pequeno excesso de álcool proporciona alto rendimento de síntese do biodiesel e o biocatalisador pode ser usado várias vezes, especialmente na forma imobilizada. A transesterificação catalisada por lipases é aplicável aos óleos vegetais refinados e brutos contendo ácidos graxos livres (AGL), resíduos de gorduras de fritura, sebo e outros resíduos de gorduras, e diversos álcoois, como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e isobutanol, como mostrado na Tabela 2.5. Mínima concentração de água no meio reacional pode ter um impacto positivo sobre a produtividade de biodiesel, pois a camada de hidratação necessária à atividade enzimática é mantida (Salis et al., 2008; Dizge et al., 2009). A concentração de AGL no óleo pode ser muito maior do que a rota química catalisada por álcalis (Ranganathan et al., 2008). Gorduras contendo triacilgliceróis (TAG) e AGL são facilmente convertidos em biodiesel porque a enzima catalisa as reações de transesterificação e esterificação (Marchetti et al., 2007).

A síntese enzimática de biodiesel pode ser efetuada na presença ou em meios isentos de solventes orgânicos, como mostrado na Tabela 2.5. Normalmente, em sistemas contendo solvente orgânico, as lipases catalisam a conversão de óleo em biodiesel quando a alíquota global de álcool é adicionada no início do processo (Ranganathan et al., 2008). Em sistemas isentos de solventes, o álcool pode ser adicionado em várias pequenas porções para manter a sua concentração em níveis mais baixos para evitar a inativação da enzima (Ranganathan et al., 2008). Esta estratégia é amplamente empregada quando se utiliza metanol como doador de grupo acila, o que não é observado para os outros tipos de álcoois (Lu et al., 2007; Qin et al., 2008; Winayanuwattikun et al., 2008; Dizge et al., 2009). Porém, em meios isentos de solventes orgânicos, a adição de todo álcool requerido no início da reação é

também utilizada (Moreira et al., 2007; Paula et al., 2007). Reações de biotransformação catalisadas em meios isentos de solventes são mais utilizadas em síntese de biodiesel, pois a elevada toxicidade, inflamabilidade e recuperação final do solvente são as suas principais desvantagens (Moreira et al., 2007).

Os custos da produção de biodiesel pela rota química ainda são inferiores aos processos enzimáticos, porém, se a poluição ambiental também é considerada, estas despesas são comparáveis (Ranganathan et al., 2008). De acordo com a Tabela 2.5, as lipases são empregadas em reações de transesterificação de óleos e gorduras preferencialmente na forma imobilizada, pois permitem a reutilização do biocatalisador e reduz o efeito de inativação da enzima na presença de álcoois de cadeia curta, o que pode baratear o processo. Neste caso, a produção de biocatalisadores na forma imobilizada com elevada atividade catalítica e estabilidade térmica torna-se viável técnica e economicamente e podem substituir os processos químicos.

Tabela 2.5. Exemplos de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos e gorduras.

Lipase	Suporte	Método de Imobilização	Óleo	Álcool	Reator	Solvente	Conversão e Tempo	Referência
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Adsorção hidrofóbica	Pinhão-manso, karanj e girassol	Propanodiol	Batelada	Isento	≥ 92% (8 h)	Kumar Modi et al., (2006)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Adsorção hidrofóbica	Pinhão-manso, karanj e girassol	Acetato de etila	Batelada	Isento	≥ 90% (12 h)	Kumar Modi et al., (2007)
Pâncreas de porco suíno	POS-PVA ativado com glutaraldeído	Covalente	Babaçu	Etanol Propanol Butanol	Batelada	Isento	75% 80% 95% (48 h)	Paula et al., (2007)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	POS-PVA ativado com epiclorigrina	Covalente	Palma	Etanol	Batelada	Isento	98% (24 h)	Moreira et al., (2007)
<i>Candida</i> sp. 99-125	Tecido	Adsorção	Banha animal	Metanol	Batelada alimentada	Hexano	87,4% (30 h)	Lu et al., (2007)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Adsorção hidrofóbica	Algodão	Metanol	Batelada	<i>t</i> -butanol	97% (24 h)	Royon et al., (2007)
Células íntegras de <i>Rhizopus chinensis</i>	-	-	Soja	Metanol	Batelada alimentada	Hexano	86% (72 h)	Qin et al., (2008)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Poliuretano ativada com GLU	Covalente	Canola	Metanol	Batelada	Isento	90% (24 h)	Dizge e Keslinler (2008)

Tabela 2.5. Exemplos de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos e gorduras (continuação).

Lipase	Suporte	Método de Imobilização	Óleo	Álcool	Reator	Solvente	Conversão e Tempo	Referência
<i>Candida rugosa</i>	Quitosana ativada com GLU	Covalente	Colza	Metanol	Batelada	Isento	63,3%	Shao et al., (2008)
<i>C. antarctica</i>	Aerogéis de sílica reforçados com quartzo	Encapsulação	Girassol	Metanol	Batelada	Isento	90% (50 h)	Nassreddine et al., (2008)
Lipozyme TL-IM (<i>T. lanuginosus</i>)	Resina acrílica	Adsorção hidrofóbica	Milho e rejeito de indústrias de extração de óleo	Metanol	Batelada alimentada	<i>t</i> -butanol	≥ 92% (12 h)	Wang et al., (2008)
<i>Candida rugosa</i>	Quitosana ativada com EDAC e GLU	Covalente	Soja	Metanol	Batelada	Isento	99% (12 h)	Ting et al., (2008)
<i>P. fluorescens</i> (Lipase AK)	Polipropileno macroporoso	Adsorção hidrofóbica	Soja	Metanol	Batelada	Isento	98% (72 h)	Salis et al., (2008)
<i>Candida cylindracea</i>	-	-	Resíduo de óleo de palma e colza em argilas	Metanol	Batelada	Diesel ou querosene	97% (12 h)	Park et al., (2008)
Novozym 435 e Lipozyme RM-IM)	Resinas acrílicas	Adsorção hidrofóbica	Palma, mamão, rambutan e pinhão-manso	Metanol	Batelada alimentada	Isento	~80% (16 h)	Winayanuwattikun et al., (2009)
<i>Candida</i> sp. 99-125	Tecido	Adsorção	Resíduos de restaurantes	Metanol	Reator de leito fixo	Hexano	91,08%	Chen et al., (2009)
<i>T. lanuginosus</i>	STY-DVB funcionalizada com PGA	Covalente	Girassol	Metanol	Batelada alimentada	Isento	63,8% (5 h)	Dizge et al., (2009)

Tabela 2.5. Exemplos de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos e gorduras (continuação).

Lipase	Suporte	Método de Imobilização	Óleo	Álcool	Reator	Solvente	Conversão e Tempo	Referência
<i>R. miehei</i> (Palatase 2000L)	Si-MCM-41 (TMOS)	Encapsulação	Trioleína	Metanol	Batelada	Isento	77% (96 h)	Macario et al., (2009)
Células íntegras de <i>E. coli</i> contendo gene de <i>Proteus sp.</i>	-	-	Soja, colza, palma, oliva, mamona, amendoim, girassol e milho	Metanol	Batelada	Iso-octano	~ 100% (12 h)	Gao et al., (2009)
Pâncreas de porco suíno	Silicato (sepiolite)	Adsorção hidrofóbica	Girassol	Metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol	Batelada	Isento	Metanol: 100% (24 h) outros álcoois: 100% em 10-12 h	Caballero et al., (2009)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Adsorção hidrofóbica	Soja	Metanol	Batelada	Isento	97% (15 h)	Zheng et al., (2009)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Adsorção hidrofóbica	Óleo de palma (rejeito)	Metanol	Reator de leito fixo	<i>t</i> -butanol	80,3% (3 h)	Halim et al., (2009)

POS-PVA: Tetra-etilortossilicato-álcool polivinílico; STY-DVB: Poliestireno-divinilbenzeno; PGA: Poliglutaraldeído; TMOS: Tetrametilortossilicato; PHB: Polihidróxibutirato; GLU: Glutaraldeído; EDAC: 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodi-imida; GLI: glicidol; EPI: epiclorigrina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

Foram utilizadas preparações de lipases comerciais de *C. antarctica* tipo B (CALB), *T. lanuginosus* (LTL), comercialmente chamada de Lipolase[®], e Lipex[®] 100L, gentilmente fornecidas pela empresa Novozymes S.A. (Araucária, Paraná). Lipase de *B. thermocatenulatus* (BTL2) clonada em *E. coli* foi produzida por fermentação pelos grupos de Engenharia de Processos Enzimáticos e Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (DEQ-UFSCar), conforme metodologia descrita por Rúa et al. (1997). Lipase de *P. fluorescens* (LPF) foi adquirida comercialmente da Amano Pharmaceutical (Nagóia, Japão) e a lipase de pâncreas de porco Tipo II (LPP) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As principais características dessas preparações são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Principais características das preparações de lipases empregadas.

Lipase	Fonte	Massa Molecular (kDa)	Resíduos lisina	Proteína (mg)	AH (U.g ⁻¹)	AE (U.mg ⁻¹ de proteína)	t _{1/2} a 70°C (min)
LTL ⁽¹⁾	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	30-35	7	9,00-18,7	1760,0-6705,8	195,6-358,6	4,8
CALB ⁽¹⁾	<i>Candida antarctica</i>	33	9	3,50	278,6	79,6	4,2
Lipex [®] 100L ⁽¹⁾	-	-	-	25,8	8217,3	318,5	5,4
LPF ⁽²⁾	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	33	7	20,0	4350,0	217,5	2,5
BTL2 ⁽²⁾	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	33	12	0,67	109,1	73,1	5,0
LPP ⁽¹⁾	Pâncreas de porco	52	1	12,2	1849,5	151,6	0,8

(1): Preparações de lipases disponíveis em solução; (2): Preparações de lipases disponíveis na forma em pó; AH: Atividade Hidrolítica da enzima solúvel (U.g⁻¹); AE: Atividade específica (U.mg⁻¹ de proteína); t_{1/2} é o tempo de meia-vida das enzimas solúveis a 70 °C (min).

3.1.2. Suportes e Ativadores

Foram utilizados como suportes para a imobilização géis de agarose 6% (Sephacrose™ CL-6B), agarose 10% (Sephacrose™ CL-10B) e octil-Sephacrose 4BCL adquiridos da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia); quitosana 85% de desacetilação adquirida da Polymar S. A. (Ceará, Brasil); octadecil-sepabeads e sepabeads EC-EP doados pela Mitsubishi Chemical Corporation (Milão, Itália); Toyopearl AF-Amino-650M e Hexil-Toyopearl comprados da Tosoh Bioscience (Montgomery, Estados Unidos). Polihidróxibutirato (PHB) nas formas granular e em pó foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Alginato de sódio e álcool polivinílico foram adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil) e J.T. Baker (New Jersey, USA), respectivamente. κ -carragenina foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Gelatina em pó marca Oetker foi adquirida no mercado local. Bagaço de cana-de-açúcar foi gentilmente doado pela Usina Zanin Açúcar e Álcool (Araraquara, SP).

Os agentes de ativação empregados foram glicidol (Sigma-Aldrich), epiclorigrina (Sigma-Aldrich) e glutaraldeído 25% (Vetec/SP). Triton X-100; N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodi-imida (EDAC); ácido 2,4,6 trinitro-benzenossulfônico (TNBS); etilenodiamina (EDA); ditioneitol (DTT) e laurinaldeído (LAU) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico.

3.1.3. Substratos

3.1.3.1. Atividade Hidrolítica e Síntese de Ésteres

Foram utilizados como substratos para a dosagem da atividade hidrolítica das lipases azeite de oliva de baixa acidez adquirido no comércio local (Carbonell) e *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) adquirido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). Para a síntese de ésteres foram empregados os ácidos butírico, láurico e oleico e os álcoois etanol e butanol adquiridos da J.T. Baker (Xalostoc, México).

3.1.3.2. Materiais de Partida para Síntese de Biodiesel

Na síntese de biodiesel foram empregados óleos vegetais de baixo custo, como óleo de babaçu adquirido da Cognis (Jacareí/SP) e óleo de palma adquirido da Agropalma (Belém/PA) e etanol anidro da Cromoline (SP). Tomando por base nos dados experimentais reportados por Da Rós (2009), nas Tabelas 3.2 e 3.3 são apresentadas as propriedades de interesse desses óleos para a síntese de biodiesel.

Tabela 3.2 – Propriedades dos óleos de palma e babaçu.

Características	Óleos Vegetais	
	Palma	Babaçu
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,33	0,65
Índice de peróxido (mEq/kg)	2,05	1,82
Índice de iodo (g I ₂ /g)	98,04	25,38
Índice de saponificação (mgKOH/g)	198,39	238,20
Massa específica (g/cm ³)	0,80	0,85
Ácidos graxos livres (%)	0,18	0,33
pH	5,80	5,00
Viscosidade cinemática (cSt)	36,87	29,51

Tabela 3.3. Composição em ácidos graxos e massa molecular dos óleos de palma e babaçu.

Ácidos Graxos	Composição dos Óleos Vegetais (%)	
	Palma	Babaçu
Ácido Capróico (C _{8:0})	-	3,50
Ácido Cáprico (C _{10:0})	-	4,50
Ácido Láurico (C _{12:0})	0,10	44,7
Ácido Mirístico (C _{14:0})	1,20	17,5
Ácido Palmítico (C _{16:0})	46,8	9,70
Ácido Esteárico (C _{18:0})	3,80	3,10
Ácido Oleico (C _{18:1})	37,6	15,2
Ácido Linoleico (C _{18:2})	10,5	1,80
Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	709,9	849,0

3.2. Metodologia Experimental

3.2.1. Determinação da Concentração de Proteína

A concentração de proteína das preparações enzimáticas comerciais foi quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 0,6 mg.mL⁻¹.

3.2.2. Determinação das Atividades Hidrolíticas

3.2.2.1. Hidrólise do *p*-Nitrofenilbutirato

A determinação da atividade hidrolítica foi realizada pela quantificação de *p*-nitrofenol a 348 nm liberado pela hidrólise de 0,4 mM de *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) em tampão fosfato 25 mM a pH 7 e 25 °C (Palomo et al., 2005). Aproximadamente, 0,1 mL de solução enzimática ou suspensão foi adicionada em 2,5 mL de substrato. Uma unidade internacional de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar 1 μmol de *p*-NPB.min⁻¹ (U) sob as condições de ensaio.

3.2.2.2. Hidrólise do Azeite de Oliva Emulsificado

A atividade lipolítica das preparações enzimáticas foi determinada pelo método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva, conforme metodologia adaptada de Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 25 g de azeite de oliva e 75 g de solução de goma arábica a 3% (m.m⁻¹). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 5 mL de solução tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0) e adicionados 0,1 g de derivado ou 0,1 mg de enzima nas formas imobilizada e solúvel, respectivamente. Os frascos

foram incubados a 37 °C por 5 min, em banho termostatzado com agitaçãõ de 150 rpm. Apõs o perõdo de incubaçãõ, a reaçãõ foi paralisada pela adiçãõ de 10 mL de uma soluçãõ de etanol a 92,5% v.v⁻¹. Os ácidos graxos liberados foram titulados com soluçãõ de NaOH 30 mM, utilizando fenolftaleína como indicador. O cálculo da atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a equaçãõ 3.1. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reaçãõ, nas condições do ensaio (37 °C, pH 8,0 e 150 rpm). Em paralelo, foi realizado um controle empregando azeite de oliva emulsificado sem a adiçãõ de enzimas, para a enzima solúvel e suporte ativado para a lipase imobilizada. As atividades foram expressas em µmoles.mg⁻¹.min⁻¹ (U).

$$U \text{ (umoles/mg.min)} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad (3.1)$$

Em que: M é a concentraçãõ molar da soluçãõ de NaOH; m é a massa de enzima solúvel (mg de proteína) ou imobilizada (grama de derivado); t é o tempo de reaçãõ (min); V_a é o volume de NaOH gasto na titulaçãõ da amostra (mL) e V_b é o volume do NaOH gasto na titulaçãõ do controle (mL).

3.2.3. Síntese de Ésteres Catalisada por Lipases

A síntese de éster foi realizada pela esterificaçãõ de butanol (100 mM) com ácido butírico em heptano a 37 °C com concentraçãõ de enzima imobilizada de 0,5 g de derivado, conforme metodologia adaptada de Soares et al. (1999). A reaçãõ foi iniciada pela adiçãõ da lipase imobilizada ao meio reacional (20 mL), em frasco fechado de 100 mL, em banho termostatzado (shaker) com agitaçãõ de 200 rpm. Alíquota de 2 mL foi retirada ao tempo final (24 h) e diluída em acetona para a quantificaçãõ do ácido butírico por titulaçãõ com NaOH 30 mM, empregando fenolftaleína como indicador. Síntese de ésteres catalisada por derivados de BTL2 adsorvida em PHB em pó foi avaliada na esterificaçãõ dos ácidos butírico, láurico e oleico (100 mM) com alcoóis de cadeia curta (etanol e butanol), variando a concentraçãõ de álcool de 100 e 900 mM nas condições descritas acima.

3.2.4. Estabilidade Térmica (Estimativa do tempo de meia-vida)

O efeito da temperatura sobre a estabilidade das lipases solúvel e imobilizada foi determinado por meio da incubação de 0,1 mg de proteína da enzima livre e 0,1 g do derivado a 70 °C em tampão fosfato pH 8,0 100 mM. Em intervalos definidos, as amostras foram retiradas e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação. A determinação da estabilidade térmica dos derivados preparados foi realizada somente para carregamento de 5 mg.g⁻¹ de suporte até inativação total da enzima. As atividades residuais foram determinadas a 37 °C, pela adição de 5 mL de substrato preparado como descrito no item 3.2.2.2. A constante de inativação térmica foi calculada pela equação 3.2, utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (1987).

$$AR = (1 - \alpha) \cdot e^{-kd \cdot t} + \alpha \quad (3.2)$$

Em que: AR é a atividade relativa (A/A₀); α é a razão entre a atividade enzimática do estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial (A₀); K_d é a constante de inativação térmica de primeira ordem (h⁻¹) e t é o tempo de incubação da solução enzimática (h).

O tempo de meia-vida da enzima, definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial, foi calculado pela equação 3.3.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{kd \cdot (1 - \alpha)} \quad (3.3)$$

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

3.2.5. Preparação de Polieletrólitos de Quitosana

3.2.5.1. Síntese dos Complexos Polieletrólíticos

Quitosana controle (4% m.m⁻¹) e os complexos polieletrólitos: (i) quitosana (4% m.m⁻¹)-gelatina (3% m.m⁻¹); (ii) quitosana (2,5% m.m⁻¹)-alginato (2,5% m.m⁻¹); (iii) quitosana (2,5% m.m⁻¹)-PVA (2,5% m.m⁻¹); (iv) quitosana (2,5% m.m⁻¹)-κ-carragenina (2,5% m.m⁻¹) e (v) quitosana pura (4 m.m⁻¹) foram dissolvidos completamente em solução de ácido acético 5% (v/v) e mantidos sob agitação mecânica por 12 h até completa solubilização, conforme metodologia descrita por Adriano et al. (2008). Após esta etapa, a solução polieletrólítica obtida foi aspergida em uma solução coagulante de NaOH 0,1 M na razão 1:10 (v.v⁻¹) para a formação dos hidrogéis, mantidos sob baixa agitação mecânica (50 rpm) por 24 h. O hidrogel preparado foi lavado exaustivamente com água destilada para a remoção de sais e filtrado a vácuo e estocados sob refrigeração para posterior aplicação. O esquema de preparação dos polieletrólitos de quitosana é mostrado na Figura 3.1.

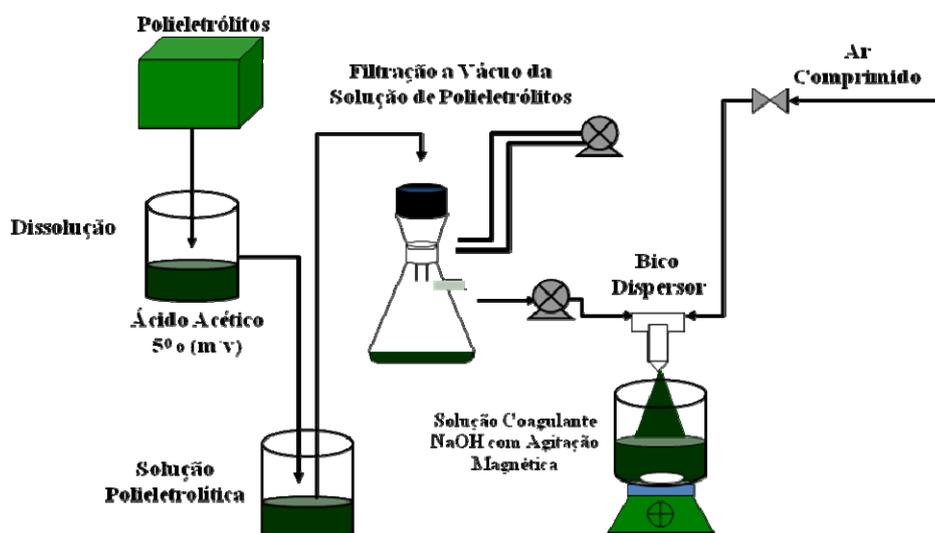


Figura 3.1. Esquema representativo de preparação dos polieletrólitos de quitosana.
Fonte: Galvão (2004).

3.2.5.2. Hidrofobização dos Polieletrólitos com TNBS

Foram adicionados 40 g de polieletrólito em 110 mL de tampão bicarbonato pH 10,05 (100 mM) para total desprotonação dos grupos amino do suporte e adicionado 1 mL de solução 5% (m.m⁻¹) do ácido 2,4,6 trinitro-benzenossulfônico (TNBS). O sistema

reacional foi mantido em incubadora refrigerada sob agitação (150 rpm) por 24 h a 25 C. Ao final, o gel foi lavado com água destilada, filtrado e estocado sob refrigeração. A reação de hidrofobização dos polieletrólitos de quitosana com TNBS é mostrada na Figura 3.2.

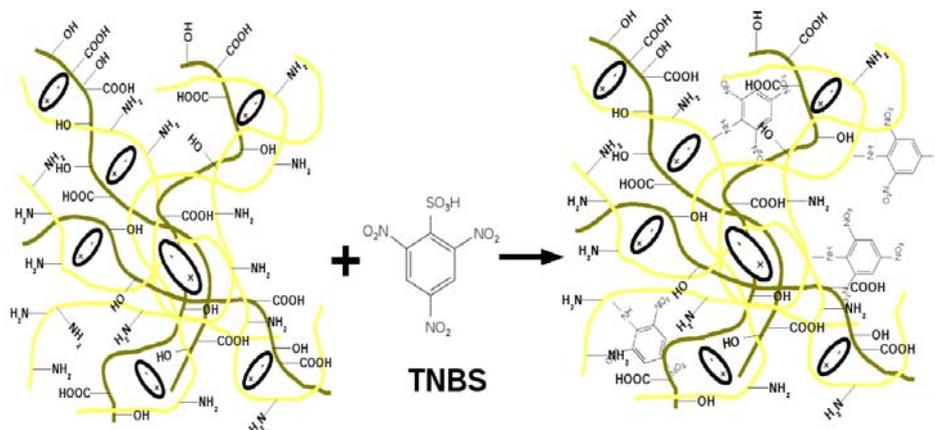


Figura 3.2. Mecanismo de reação entre TNBS e os grupos amino de hidrogéis de quitosana.

3.2.5.3. Hidrofobização do Complexo Polieletrólítico Quitosana-Alginato com Laurinaldeído

O complexo polieletrólítico quitosana-alginato reticulado com laurinaldeído foi preparado em diferentes concentrações (1, 3 e 5% m.m⁻¹) a 25 °C. A reação de reticulação foi realizada em tampão fosfato pH 7,0 (200 mM) por um período de 1 h. Ao final, o gel foi lavado com água destilada, filtrado e estocado sob refrigeração.

3.2.6. Protocolos de Ativação dos Suportes

3.2.6.1. Preparação do Gel Gliceril-Suporte Ativado com Glicidol

Inicialmente, o suporte (10 g) foi lavado com água destilada em abundância e seco a vácuo. Em seguida, 3 mL de água destilada foram adicionadas e a suspensão foi mantida sob suave agitação em banho de gelo. Numa solução de NaOH 1,7 M (5 mL) foram

adicionados 0,15 g de borohidreto de sódio (NaBH_4), em banho de gelo, para evitar perda do agente redutor por liberação de H_2 . A solução básica de NaBH_4 foi acrescentada à suspensão do suporte, sob agitação. Em seguida, foram adicionados lentamente, 3,43 mL de glicidol em excesso, para não provocar aumento da temperatura no meio reacional (Guisán, 1988). A suspensão foi mantida, sob agitação mecânica, em recipiente aberto por 15 h à temperatura ambiente para a liberação de H_2 formado no meio reacional. O suporte ativado foi lavado com água destilada até pH neutro e seco a vácuo.

3.2.6.2. Preparação do Gel Gliceril-Suporte Ativado com Epicloridrina

Uma massa de 10 g de suporte foi lavada com água destilada em abundância e seca à vácuo. Foi preparada uma solução de NaOH 2 M (100 mL) e adicionada 0,6 g de borohidreto de sódio (NaBH_4), em banho de gelo. À suspensão de suporte, foi acrescentada a solução básica de NaBH_4 sob agitação em banho de gelo. Adicionou-se lentamente, em seguida, 10 mL de epicloridrina, sempre verificando se não há aumento na temperatura (Beppu et al., 2004). A suspensão foi mantida sob suave agitação em recipiente aberto por 15 h à temperatura ambiente para liberação de H_2 formado no meio reacional. O suporte ativado foi lavado com água destilada até pH neutro e seco à vácuo.

3.2.6.3. Preparação dos Géis Glioxil-Suporte

10 g do gel gliceril-suporte, obtido pelos dois diferentes métodos citados anteriormente (itens 3.2.6.1 e 3.2.6.2), foi suspenso em 100 mL de água destilada e adicionados 100 μmoles de periodato de sódio por grama de suporte para agarose 6BCL, sepabeads, amino-Toyopearl, PHB e bagaço de cana-de-açúcar e 300 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ de suporte, para os complexos polieletrólíticos de quitosana hidrofobizados e não hidrofobizados com TNBS e agarose 10BCL. Um μmol de NaIO_4 oxida um μmol de OH do gel, portanto, dependendo do grau de ativação desejado (quantidade de grupos aldeídos. mL^{-1} de gel gerados

na superfície da agarose) a quantidade de periodato necessária foi calculada utilizando a equação 3.4. A oxidação foi mantida em suave agitação (agitador mecânico) por 2 h. O suporte oxidado foi lavado exaustivamente com água destilada, para eliminar formaldeído produzido e o gel foi estocado a 4 °C.

$$M_{NaIO_4} (g) = \frac{(\mu\text{moles aldeído} / \text{mL de gel}) \cdot V_{\text{gel}} \cdot PM_{NaIO_4}}{1.10^6} \quad (3.4)$$

Em que: M_{NaIO_4} é a massa de periodato de sódio utilizada (g); PM_{NaIO_4} é a massa molecular do periodato de sódio ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$); V_{gel} é o volume de gel utilizado (mL) e a relação $\mu\text{moles aldeído} \cdot \text{mL}^{-1}$ de gel é a concentração de grupos aldeído presentes por unidade de volume de gel.

3.2.6.4. Preparação do Gel Glioxil-Amino-Glutaraldeído

Inicialmente, 40 mL de solução de etilenodiamina (EDA) 2 M a pH 10,0 foi adicionado a 10 g do gel glioxil-suporte ativado com glicidol (glioxil-agarose, glioxil-toyopearl, glioxil-bagaço e glioxil-PHB), conforme metodologia descrita por Fernández-Lafuente et al. (1993). Este sistema foi mantido sob agitação por 2 h à temperatura ambiente. Após a aminação, foi adicionado ao gel glioxil-amino aproximadamente 0,57 g de borohidreto de sódio (NaBH_4). O sistema foi mantido por mais 2 h sob agitação branda (Shaker) e em frasco aberto à temperatura ambiente. Após este período, o gel foi lavado com 1 L de solução tampão acetato 100 mM (pH 4,0) em abundância para remoção do NaBH_4 residual e posteriormente lavado com 1 L de solução tampão borato 100 mM (pH 9,0) para a desprotonação dos grupos amino do suporte. Para finalizar, o suporte glioxil-amino foi lavado exaustivamente com água destilada e secado a vácuo. Foram adicionados ao gel glioxil-amino obtido uma solução de glutaraldeído a 25% (16,8 mL) diluída em tampão fosfato 200 mM pH 7,0 (11,2 mL). O recipiente contendo o gel foi coberto com papel alumínio e mantido sob agitação em incubadora refrigerada à temperatura ambiente por 18 h. Ao final deste tempo, o gel foi lavado com água em abundância para a remoção do glutaraldeído residual.

3.2.6.5. Ativação dos Polieletrólitos de Quitosana com Glutaraldeído

Foram adicionados aos géis de quitosana controle e complexos polieletrólíticos nas formas hidrofobizada e não hidrofobizada com TNBS, 11,2 mL de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 7,0) e 16,8 mL de glutaraldeído a 25%. O recipiente contendo o gel foi coberto com papel alumínio e colocado sob agitação em shaker (150 rpm) à temperatura ambiente por 1 h. Ao final, o gel foi lavado com água em abundância para a remoção do glutaraldeído residual.

3.2.6.6. Oxidação do Hidrogel Quitosana-Alginato-TNBS com Periodato de Sódio

10 g do gel quitosana-alginato-TNBS não ativado foi suspenso em 100 mL de água bidestilada e adicionados 300 μ moles de periodato de sódio por grama de suporte. A oxidação foi mantida em suave agitação (agitador mecânico) por 2 h. O suporte oxidado foi lavado exaustivamente com água destilada, para eliminar formaldeído produzido e o gel foi estocado a 4 °C.

3.2.6.7. Preparação de Epóxi-Quitosana-Alginato

10 g de quitosana foram dissolvidas em 400 mL de solução de ácido acético 5% (v.v⁻¹) sob agitação mecânica por 2 h. Em seguida, foram adicionados 40 mL de metanol e 4 mL de anidrido acético. Após 1 h, foram adicionados 10 g de alginato ao sistema e mantido sob agitação por 12 h. À esta solução foi adicionado 3,6 L de solução de NaOH 110 mM para a formação do hidrogel e mantidos sob baixa agitação mecânica (50 rpm) por 12 h. O hidrogel foi lavado exaustivamente com água destilada, filtrado a vácuo e estocado sob refrigeração. Para cada 10 g do hidrogel obtido, foram adicionados 100 mL de N-N-dimetilformamida e a mistura mantida por 30 min a 60 °C. Em seguida, foram adicionados 0,8 g de KOH

dissolvidos em 3 mL de isopropanol e, ao final, 10 mL de epícloridrina, conforme metodologia adaptada de Fangkangwanwong et al. (2006). O sistema foi mantido sob agitação a 60 °C por 12 h. Após a epoxilação, o gel foi lavado e filtrado a vácuo e estocado sob refrigeração.

3.2.6.8. Preparação de Epóxi-Tiol-Quitosana-Alginato

Após a obtenção do gel epóxi-quitosana-alginato, 10 g deste suporte foi suspenso em 200 mL de tampão bicarbonato 200 mM pH 8,5 e, em seguida, foi adicionado 200 mL de solução de EDTA 1 mM. A suspensão foi mantida em agitação e foi adicionado 0,68 g de DTT (ditiotreitól), com concentração final de 11 mM, conforme metodologia descrita por Grazu et al. (2003). O suporte foi mantido em agitação mecânica por 1 h a 25 °C. Ao final, o gel tiolado foi lavado com tampão bicarbonato 200 mM pH 8,5 e tampão acetato 100 mM pH 5,0 e finalmente com água bidestilada. O gel tiolado foi filtrado a vácuo e estocado a 4 °C em tampão fosfato 50 mM pH 7,0.

3.2.6.9. Quantificação de Grupos Glioxil em Agarose

A quantificação de grupos aldeídos presentes na superfície do gel de agarose ativado foi determinada pela concentração de periodato de sódio não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril. O periodato (IO_4^-) não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril (álcoois) reage com o iodeto (I^-) em excesso, gerando iodo na forma do íon tri-iodeto (I_3^-), o qual é quantificado por colorimetria. É necessário iodeto em excesso para gerar este íon, pois o iodo na forma I_2 é muito volátil.

Em solução ácida há perda de iodo, por volatilização, devido à oxidação de iodeto por oxigênio atmosférico. Assim, a quantificação de periodato de sódio não consumido foi realizada em meio contendo bicarbonato de sódio, pois a oxidação atmosférica de iodeto é desprezível em solução neutra ou básica (Vogel, 1981). Em uma cubeta de vidro contendo 3

mL de uma solução 1:1 (v.v⁻¹) de iodeto de potássio (10% m.m⁻¹) e bicarbonato de sódio saturado (10% m.m⁻¹) foram adicionados 75 µL de uma solução aquosa de periodato, preparada nas mesmas condições da suspensão do gel de gliceril-agarose. Em um espectrofotômetro fez-se uma varredura de comprimentos de onda, escolhendo-se aquela que fornecesse uma absorvância entre 0,7 e 0,8, na faixa de comprimento de onda (λ) próxima a 430 nm. Uma amostra de 75 µL do sobrenadante final da oxidação foi posteriormente adicionada a 3 mL da solução 1:1 descrita acima, correspondendo o decréscimo na absorvância à porcentagem de grupos aldeídos formados. A absorvância inicial medida da solução aquosa de periodato, preparada nas mesmas condições de suspensão de oxidação do gel gliceril-agarose, correspondia a 100% do periodato não consumido. Como a reação de oxidação de grupos gliceril (álcoois) a aldeídos é equimolar, o total de periodato consumido é igual a concentração de grupos glioxil formado na superfície do suporte.

3.2.6.10. Quantificação de Grupos Epóxi

Análise dos grupos oxirano (epóxi) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Sundberg e Porath (1974) com pequenas modificações. A formação de grupos hidroxila formado pela hidrólise dos grupos oxirano foi quantificada por titulação com solução 100 mM de HCl. Inicialmente, 15 mL de solução de Na₂S₂O₃ 1,3 M foi ajustada a pH 7,0 pela adição de ácido clorídrico. Em seguida, foram adicionados 100 mg do gel epóxi e o pH do meio reacional foi mantido em 7,0 com a adição de HCl. A quantidade de grupos oxirano presente nos hidrogéis foi, então, calculada a partir da quantidade de ácido clorídrico necessária para manter a neutralidade da suspensão.

3.2.7. Caracterização Morfológica dos Polieletrólitos de Quitosana

3.2.7.1. Adsorção de Corante Hidrofóbico Rosa de Bengala

A hidrofobização do polieletrólito quitosana-alginato com TNBS produz uma superfície hidrofóbica que pode ser determinada pela concentração de corante hidrofóbico (Rosa de Bengala) adsorvida por massa de gel. Para determinar a hidrofobicidade, uma massa fixa de hidrogel (0,15 g) foi adicionada em frascos contendo 20 mL de solução aquosa de corante (20 µg/mL) por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação. Em intervalos de 15 min, alíquotas do sobrenadante foram retiradas para a quantificação da concentração de corante adsorvida, analisada por absorvância a 549 nm (Gupta e Jabrail, 2006). Estes ensaios foram realizados em triplicata. A eficiência de adsorção do corante foi determinada pela relação entre a concentração de corante adsorvido pela massa de gel empregada nestes experimentos.

3.2.7.2. Estimativa da Porcentagem de Hidratação

A porcentagem de hidratação dos hidrogéis modificado e não modificado quimicamente foi estimada, de acordo com a metodologia estabelecida por Gupta e Jabrail (2006). Os hidrogéis (0,15 g) foram incubados em 20 mL de tampão fosfato pH 7,0 (100 mM) por 24 h. Após este período, o excesso de água adsorvido pelo gel foi removido com papel de filtro e, em seguida, o hidrogel foi pesado em uma balança analítica e determinada a porcentagem de hidratação, conforme mostrada na equação 3.5.

$$PH (\%) = \frac{M_f - M_i}{M_i} \cdot 100 \quad (3.5)$$

Em que: PH é a porcentagem de hidratação (%); M_f é a massa de gel após a hidratação (g) e M_i é a massa de gel no tempo inicial (g).

3.2.7.3. Estimativa da Porcentagem de Reticulação no Complexo Polieletrólítico Quitosana-Alginato

5 mg do complexo polieletrólítico quitosana-alginato hidrofobizado por TNBS e ativado por glicidol, epícloridrina e glutaraldeído foram adicionados em uma cubeta

contendo 1 mL de solução de NaHCO₃ 4% (m.v⁻¹) pH 8,5 e em seguida foi adicionado 1 mL de solução de TNBS 0,5% (v.v⁻¹), conforme metodologia adaptada de Kathuria et al. (2009). O sistema foi mantido sob repouso a 40 °C por 2h. Após esta etapa, foram adicionados 3 mL de solução de HCl 6M e as amostras foram incubadas a 60 °C por 1,5 h e, ao final, a absorvância da solução final resultante foi lida a 345 nm. Como controle foi empregado o polieletrólito quitosana-alginato não hidrofobizado e não ativado pelos agentes e a adição de solução HCl foi anterior à solução de NaHCO₃ e TNBS. A equação de estimativa da porcentagem de reticulação dos suportes é mostrada na equação 3.6.

$$PR(\%) = 1 - \left(\frac{Abs_{amostra} / m_{amostra}}{Abs_{controle} / m_{controle}} \right) \quad (3.6)$$

Em que: PR é a porcentagem de reticulação (%); Abs_{amostra} é a absorvância da solução da amostra hidrofobizada ou ativada; m_{amostra} é a massa das amostras (mg); Abs_{controle} é a absorvância da solução da amostra controle e m_{amostra} é a massa do controle (mg).

3.2.8. Imobilização de Lipases por Diferentes Protocolos

3.2.8.1. Adsorção Física de Lipases em Suportes Hidrofóbicos Octil-Agarose, Hexil-Toyopearl e Octadecil-Sepabeads

Lipases BTL2, CALB e LTL foram adsorvidas em suportes hidrofóbicos octil-agarose, hexil-toyopearl e octadecil-sepabeads na relação 1:60 (suporte:solução enzimática) em tampão fosfato pH 7,0 5 mM por 30 min, conforme metodologia descrita por Bastida et al. (1998). Nestes ensaios foram empregados carregamentos de 1 mg proteína.g⁻¹ de gel. A atividade hidrolítica da suspensão e do sobrenadante foram medidas periodicamente durante a imobilização pela hidrólise do *p*-NPB. Ao final, o derivado foi lavado com água bidestilada, seco a vácuo e estocado a 4 °C.

3.2.8.2. Adsorção Física de Lipases em PHB

Inicialmente, 10 g de PHB em pó e granular foram embebidos em 15 mL de etanol anidro e mantidos sob baixa agitação por 6 h a 25 °C, conforme metodologia descrita por Adlercreutz (2006). Após esta etapa, foram adicionadas as soluções de lipases BTL2, CALB, LTL, Lipex[®] 100L ou LPF na relação 1:60 (suporte:solução enzimática) em tampão fosfato pH 7,0 5 mM por 12 e 18 h, empregando PHB nas formas em pó e granular, conforme metodologia descrita por Bastida et al. (1998). Nestes ensaios foram empregados carregamentos de 5 mg proteína.g⁻¹ de suporte para as lipases disponíveis comercialmente (CALB, LTL, Lipex[®] 100L e LPF) e de 10 mg proteína.g⁻¹ de suporte para a lipase BTL2. Ao final, os derivados foram filtrados a vácuo e estocados a 4 °C.

3.2.8.3. Aminoação de Lipases Imobilizadas em Octil-Agarose

4 g de lipases CALB e BTL2 adsorvidas em octil-agarose foram adicionados em 36 mL de solução de EDA 1 M pH 4,75 e, em seguida, foi adicionado EDAC sólido à suspensão, com uma concentração final de 10⁻² M, conforme metodologia descrita por López-Gallego et al. (2005). O sistema foi mantido em suave agitação por 2 h a 25 °C. Ao final, o derivado aminado foi lavado exaustivamente com água destilada e estocado a 4 °C. A dessorção das enzimas aminadas quimicamente foi realizada em tampão fosfato pH 10,05 50 mM na presença de Triton X-100 1% (relação 1:5). O procedimento experimental de aminoação química é mostrado na Figura 3.3 (Fernandez-Lorente et al., 2008).

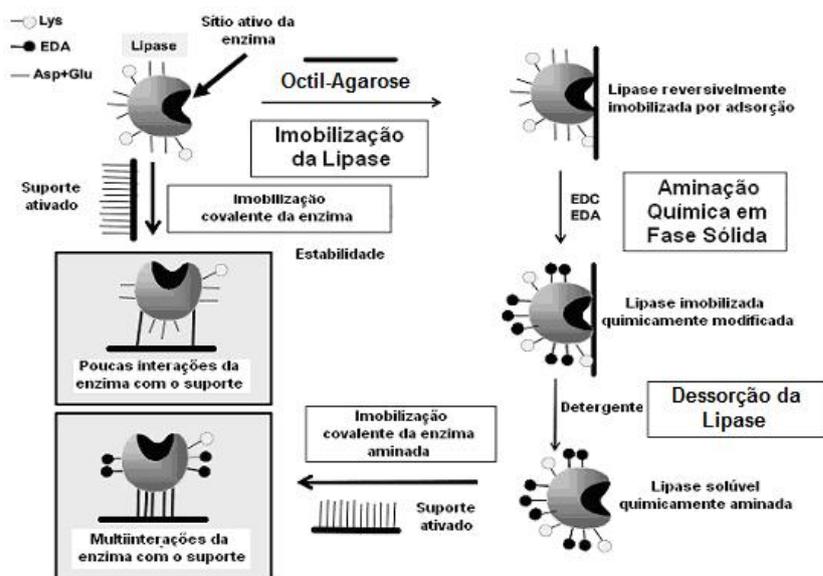


Figura 3.3. Esquema representativo do processo de aminação química de enzimas em fase sólida por EDA na presença de EDAC.
 Fonte: Fernandez-Lorente et al. (2008).

3.2.8.4. Protocolo de Imobilização Multipontual das Lipases Aminadas CALB e BTL2 em Glioxil-Agarose 10 BCL e Glioxil-Sepabeads

Após a etapa de desorção das lipases aminada e não aminada quimicamente, conforme metodologia descrita acima no item 3.2.8.3, a solução foi diluída em uma relação de 1:2 com tampão bicarbonato 50 mM pH 10,05 e imobilizada a 25 °C por 24 h, mantido sob suave agitação com o auxílio de um hibridizador. Alíquotas de 0,1 mL do meio reacional contendo tampão de imobilização e lipase foram retiradas para a quantificação da atividade sobre a hidrólise do *p*-NPB a pH 7,0 tampão fosfato 25 mM. Após a imobilização, foi quantificada no sobrenadante a atividade hidrolítica residual. Em seguida, os derivados foram reduzidos com borohidreto de sódio (1 mg.mL⁻¹ de suspensão) por 30 min. Ao final, o gel foi lavado com água destilada em abundância para a remoção de enzima residual e borohidreto de sódio.

3.2.8.5. Imobilização Multipontual de LPP em Glioxil-Agarose 6BCL

A imobilização da lipase LPP foi realizada em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,05 na ausência e presença de estabilizantes como cloreto de cálcio (10 mM), polietilenoglicol-1500 (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de solução enzimática), Triton-X-100 (0,10%), ácidos butírico e oleico (100 mM) e em tampão borato 50 mM pH 10,05 empregando carregamento de proteína de 5 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de gel. A solução enzimática foi adicionada ao suporte na relação 10:1 e alíquotas do meio reacional foram retiradas, inicialmente, para a quantificação da concentração de proteína e atividade hidrolítica sobre a hidrólise do azeite de oliva emulsificado. A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantida a 25 °C por 24 h sob suave agitação, com o auxílio de um hibridizador. Após a imobilização, foram quantificadas, no sobrenadante, a concentração de proteína e atividade hidrolítica residual. Em seguida, foi adicionada à suspensão 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de borohidreto de sódio para a redução das bases de Schiff para a formação de aminas secundárias estáveis por 30 min. Os derivados preparados e reduzidos com NaBH_4 foram lavados exaustivamente com água bidestilada e estocados a 4 °C. Em seguida, foi quantificada a atividade hidrolítica aparente do derivado conforme metodologia descrita no item 3.2.2.2.

3.2.8.6. Imobilização Multipontual das Lipases em Suportes Glioxil e Ativados com Glutaraldeído

A imobilização das lipases LTL, CALB, Lipex[®] 100L ou LPF foi realizada em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,05 na presença de Triton X-100 (0,15%), empregando diferentes carregamentos de proteína (5, 10, 30, 60 e 80 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de gel). Foram empregados como suportes agarose 6BCL, polieletrólitos de quitosana hidrofobizados e não hidrofobizados com TNBS, quitosana-alginato hidrofobizado com laurinaldeído, amino-toyopearl, PHB e bagaço de cana-de-açúcar ativados por diferentes protocolos. A solução enzimática foi adicionada ao suporte na relação 10:1 e alíquotas do meio reacional foram retiradas, inicialmente, para a quantificação da concentração de proteína e atividade

hidrolítica sobre a hidrólise do azeite de oliva emulsificado. A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantida em suave agitação, com o auxílio de um hibridizador, a 25 °C por um período de 4-72 h. Após a imobilização, foram quantificadas, no sobrenadante, a concentração de proteína e atividade hidrolítica residual. Em seguida, foi adicionada à suspensão 1 mg.mL⁻¹ de borohidreto de sódio para a redução das bases de Schiff para a formação de aminas secundárias estáveis por 30 min. Os derivados preparados e reduzidos com NaBH₄ foram lavados exaustivamente com água bidestilada e estocados a 4 °C. Em seguida, foi quantificada a atividade hidrolítica aparente do derivado conforme metodologia descrita no item 3.2.2.2.

3.2.8.7. Imobilização Multipontual das Lipases em Epóxi-Quitossana-Alginato

A imobilização das lipases microbianas LTL, Lipex[®] 100L ou LPF em matriz epóxi foi realizada em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,05 na presença de Triton X-100 (0,15%), empregando diferentes carregamentos de proteína (5, 10, 30, 60 e 80 mg.g⁻¹ de gel). A solução enzimática foi adicionada ao suporte na relação 10:1 e alíquotas do meio reacional foram retiradas, inicialmente, para a quantificação da concentração de proteína e atividade hidrolítica pela hidrólise do azeite de oliva emulsificado. A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantida em suave agitação com o auxílio de um hibridizador a 25 °C por um período de 24-72 h. Após a imobilização, foram quantificadas, no sobrenadante, as concentrações de proteína e atividades hidrolíticas residuais. O gel foi lavado com água bidestilada em abundância para a remoção de enzima residual e em seguida foi quantificada a atividade hidrolítica aparente do derivado conforme metodologia descrita no item 3.2.2.2. Ao final da imobilização, os derivados foram incubados em solução 3M de glicina pH 8,0 para bloquear os grupos epóxi remanescentes após a imobilização por 24 h e, ao final, os derivados foram lavados exaustivamente com água bidestilada e estocados a 4 °C.

Na Tabela 3.4 estão sumarizadas as condições de preparo dos derivados de LTL, LPF, CALB, BTL2, Lipex[®] 100L e LPP e os métodos de imobilização empregados, bem como as variáveis testadas nos diferentes protocolos de imobilização.

Tabela 3.4. Condições de preparação dos derivados de LTL, LPF, Lipex[®] 100L, LPP, BTL2 e CALB imobilizados por diferentes protocolos.

Lipase	Tipo de Ligação	Suporte	Agente de Ativação	(Condições experimentais) –Variáveis na Imobilização
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL)	Adsorção física	Octil-agarose, hexil-toyopearl, octadecil-sepabeads (item 3.2.8.1)	-	(Tampão fosfato 5 mM, pH 7,00 a 25 °C com carregamento de 1 mg proteína.g ⁻¹ gel por 1 h)
		PHB em pó e granular (item 3.2.8.2)	-	(Tampão fosfato 5 mM, pH 7,00, 25 °C, 5 mg proteína.g ⁻¹ gel, 12 h, Triton X-100)
	Covalente	Agarose 6BCL (item 3.2.8.6)	Glicidol Epicloridrina Glutaraldeído	(Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05, 25 °C, 0,15% de Triton X-100) - Carga (5 – 80 mg proteína.g ⁻¹ gel) - Tempo de imobilização (4 – 72 h)
		Quitosana pura, Quitosana-gelatina Quitosana- carragenina Quitosana-PVA, Quitosana-alginato (Modificados ou não quimicamente com TNBS) (item 3.2.8.6)	Glicidol Epicloridrina Glutaraldeído	(Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25 °C) - Carga (5 – 50 mg proteína.g ⁻¹ gel) - Tempo de imobilização (12 – 24 h) - Redução de bases de Schiff
		Bagaço de cana-de-açúcar (item 3.2.8.6)	Glicidol Epicloridrina Glutaraldeído	(Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25 °C, carregamento de 5 mg proteína.g ⁻¹ gel)
		Poli-hidróxibutirato (PHB) (item 3.2.8.6)	Glicidol Glutaraldeído	(Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25 °C carregamento de 5 mg proteína.g ⁻¹ gel)
		Epóxi-quitosana-alginato (item 3.2.8.7)	Epicloridrina	(Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25 °C, 0,15% de Triton X-100) -Carga máxima (5 – 80 mg proteína.g ⁻¹ gel) -Tempo de imobilização (12 – 72 h)
		Epóxi-tiol-quitosana-alginato (item 3.2.8.7)	Epicloridrina	(Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25 °C, 0,15% de Triton X-100) -Carga máxima (5 – 80 mg proteína.g ⁻¹ gel) --Tempo de imobilização (12 – 72 h)
		Amino-toyopearl (item 3.2.8.6)	Glicidol Epicloridrina Glutaraldeído	(Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25 °C, 0,15% de Triton X-100) -Carga máxima (5 – 80 mg proteína.g ⁻¹ gel) -Tempo de imobilização (12 – 72 h)

Tabela 3.4. Condições de preparação dos derivados de LTL, LPF, Lipex[®] 100L, LPP, BTL2 e CALB imobilizados por diferentes protocolos (continuação).

Lipase	Tipo de Ligação	Suporte	Agente de Ativação	(Condições experimentais) –Variáveis na Imobilização
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LPF)	Adsorção física	PHB em pó e granular (item 3.2.8.2)	-	Tampão fosfato 5 mM, pH 7,00 a 25 °C com carregamento de 5 mg proteína.g ⁻¹ de gel por 12 h
		Covalente	Agarose 6BCL (item 3.2.8.6)	Glicidol Epilcloridrina Glutaraldeído
	Covalente	Amino-toyopearl (item 3.2.8.6)	Glicidol Epilcloridrina Glutaraldeído	Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25°C, na presença de 0,15% de Triton X-100 - Carga máxima (5 – 80 mg proteína.g ⁻¹ de gel)
		Epóxi-quitosana-alginato (item 3.2.8.7)	Epilcloridrina	Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25°C, na presença de 0,15% de Triton X-100 -Carga máxima (5 – 80 mg proteína.g ⁻¹ de gel)
<i>Candida antarctica</i> (CALB)	Adsorção física	Octil-agarose, hexil-toyopearl, octadecil-sepabeads (item 3.2.8.1)	-	(Tampão fosfato 5 mM, pH 7,00 a 25 °C com carregamento de 1 mg proteína.g ⁻¹ gel por 1 h
		PHB em pó e granular (item 3.2.8.2)	-	Tampão fosfato 5 mM, pH 7,00 a 25 °C com carregamento de 5 mg proteína.g ⁻¹ de gel por 12 h
	Covalente	Agarose 10BCL (item 3.2.8.4)	Glicidol	Tampão bicarbonato 50 mM, pH 10,05 a 25 °C, na presença de 1% de Triton X-100 -Efeito da aminação química da enzima na estabilidade térmica e em solventes
		Sepabeads (item 3.2.8.4)	Glicidol	(Tampão bicarbonato 50 mM, pH 10,05 a 25 °C, na presença de 1% de Triton X-100) -Efeito da aminação química da enzima na estabilidades térmica e em solventes
		Agarose 6BCL (item 3.2.8.6)	Glicidol Epilcloridrina Glutaraldeído	Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25 °C, na presença de 0,15% de Triton X-100 -Carga máxima (5 – 80 mg proteína.g ⁻¹ de gel) -Tempo de imobilização (24 – 72 h)

Tabela 3.4. Condições de preparação dos derivados de LTL, LPF, Lipex[®] 100L, LPP, BTL2 e CALB imobilizados por diferentes protocolos (continuação).

Lipase	Tipo de Ligação	Suporte	Agente de Ativação	(Condições experimentais) –Variáveis na Imobilização
<i>Bacillus thermocatenuatus</i> (BTL2)	Adsorção física	Octil-agarose (item 3.2.8.1)	-	Tampão fosfato 5 mM, pH 7,00 a 25 °C com carregamento de 10 mg proteína.g ⁻¹ de gel por 12 h
		PHB em pó e granular (3.2.8.2)	-	Tampão fosfato 5 mM, pH 7,00 a 25 °C com carregamento de 10 mg proteína.g ⁻¹ de gel por 12 h
	Covalente	Agarose 10BCL (item 3.2.8.4)	Glicidol	Tampão bicarbonato 50 mM, pH 10,05 a 25 °C, na presença de 1% de Triton X-100 -Efeito da aminação química da enzima sobre a estabilidade térmica e estabilidade em solventes orgânicos
Lipex [®] 100L	Adsorção física	PHB em pó e granular (item 3.2.8.2)	-	Tampão fosfato 5 mM, pH 7,00 a 25 °C com carregamento de 5 mg proteína.g ⁻¹ de gel por 12 h
		Covalente	Agarose 6BCL (item 3.2.8.6)	Glicidol Epicloridrina Glutaraldeído
		Epóxi-quitosana-alginato (item 3.2.8.7)	Epicloridrina	Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 a 25 °C, na presença de 0,15% de Triton X-100 -Carga máxima (5 – 80 mg proteína.g ⁻¹ de gel)
Pâncreas de porco (LPP)	Covalente	Agarose 6BCL (item 3.2.8.5)	Glicidol Epicloridrina Glutaraldeído	(Tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,05 e tampão borato 50 mM pH 10,05 a 25 °C, na presença de Triton X-100, íons cálcio, polietilenoglicol (PEG 1500), ácido oleico, glicerol)

3.2.9. Cálculo dos Parâmetros de Imobilização

3.2.9.1. Cálculo da Concentração de Proteína Imobilizada

A concentração de proteína imobilizada (PI) foi quantificada com base na concentração de proteína oferecida e a concentração de proteína presente no meio reacional após o processo de imobilização, como mostrada na equação 3.7.

$$PI (\%) = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \cdot 100 \quad (3.7)$$

Em que: PI é a porcentagem de proteína imobilizada (%); P_0 e P_f são as concentrações de proteínas no tempo inicial e final no sobrenadante (mg.mL^{-1}), respectivamente.

3.2.9.2. Cálculo da Atividade Recuperada

O cálculo da atividade recuperada (AR) foi determinado pela relação entre a atividade hidrolítica aparente do derivado e o produto da atividade inicial oferecida e a concentração de enzima imobilizada, conforme mostrado na equação 3.8.

$$AR (\%) = \frac{U_{gel}}{PI \cdot U_0} \cdot 100 \quad (3.8)$$

Em que: AR é a atividade recuperada (%); U_{gel} é a atividade hidrolítica aparente do derivado (U.g^{-1} de suporte); U_0 é a atividade oferecida no início da imobilização (U.mg^{-1} de proteína) e PI é a concentração de proteína imobilizada por grama de gel (mg.g^{-1} de gel).

3.2.9.3. Cálculo do Fator de Estabilidade

O fator de estabilidade (FE) foi calculado pela relação entre o tempo de meia-vida da lipase imobilizada e a lipase solúvel medidos a 70 °C, determinado no item 3.2.4, como mostrado na equação 3.9.

$$FE = \frac{t_{1/2} \text{ imobilizada}}{t_{1/2} \text{ solúvel}} \quad (3.9)$$

Em que: FE é o fator de estabilidade; $t_{1/2}$ solúvel é o tempo de meia-vida para a lipase solúvel e $t_{1/2}$ imobilizada é o tempo de meia-vida para a lipase imobilizada.

3.2.9.4. Cálculo do Rendimento de Imobilização

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado pela relação entre a atividade enzimática imobilizada pela atividade inicialmente oferecida determinada no item 3.2.4, como mostrado na equação 3.10.

$$RI (\%) = \frac{U_{\text{imobilizada}}}{U_0} \quad (3.10)$$

Em que: RI é o rendimento de imobilização; $U_{\text{imobilizada}}$ é a atividade enzimática imobilizada e U_0 é a atividade oferecida no início da imobilização ($U \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína).

3.2.10. Caracterização das Propriedades Bioquímicas da Lipase LTL Solúvel e Imobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS

3.2.10.1. Influência da Temperatura

Foi verificada a influência da temperatura sobre a atividade das lipases solúvel

e imobilizada empregando a reação de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita no item 3.2.2.2, na faixa de temperatura entre 30 a 90 °C (Soares et al., 1999).

3.2.10.2. Influência do pH

A influência do pH foi avaliada, empregando a reação de hidrólise do azeite de oliva 25% (m.m⁻¹) emulsificado com solução aquosa de goma arábica 3% (m.m⁻¹) e temperatura ótima para cada preparação em tampão fosfato 0,1 M na faixa de pH de 5,0 a 9,0 para as lipases nas formas imobilizada e solúvel, respectivamente, conforme metodologia descrita por Soares et al. (1999).

3.2.11. Síntese de Biodiesel por Transesterificação Enzimática

3.2.11.1. Etanólise do Óleo de Palma Catalisada por Lipases Imobilizadas por Ligação Covalente Multipontual

As reações de transesterificação catalisadas por lipases LTL e LPF imobilizadas em géis de agarose, amino-toyopearl e quitosana-alginato-TNBS ativados por diferentes protocolos foram realizadas em frascos fechados contendo 20 g da mistura óleo de babaçu e etanol anidro na relação molar 1:18 em meio isento de solventes, conforme metodologia descrita por Moreira et al. (2007). Os derivados foram adicionados na proporção de 2 mg proteína imobilizada.g⁻¹ de óleo. As reações foram conduzidas a 45 °C em incubadora rotativa com agitação de 180 rpm por um período máximo de 48 h.

3.2.11.2. Etanólise do Óleo de Babaçu Catalisada por Lipases Imobilizadas por Ligação Covalente Multipontual

As reações de transesterificação catalisadas por lipases LTL e LPF imobilizadas em géis glioxil-agarose e amino-toyopearl ativados por glicidol e epiclorigrina foram realizadas em frascos fechados contendo 20 g de óleo de babaçu e etanol anidro na relação molar 1:9 em meio isento de solventes. Os derivados foram adicionados na proporção de 2 mg proteína imobilizada.g⁻¹ de óleo. As reações foram conduzidas a 45 °C em incubadora rotativa com agitação de 180 rpm por um período máximo de 48 h.

3.2.11.3. Etanólise do Óleo de Babaçu Catalisada por Lipases Imobilizadas em PHB.

As reações de transesterificação catalisadas por lipases imobilizadas por adsorção em PHB granular e em pó foram realizadas em frascos fechados contendo 20 g de óleo de babaçu e etanol anidro na relação molar 1:9 em meio isento de solventes. Os derivados foram adicionados na proporção de 10% em massa em relação aos materiais de partida envolvidos na reação. As reações foram conduzidas a 45 °C em incubadora rotativa com agitação de 180 rpm por um período máximo de 96 h.

3.2.12. Purificação do Biodiesel

Para a purificação do biodiesel formado, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída basicamente de lavagens com água destilada a quente (80 °C) na relação biodiesel:água de 1:2. O volume da amostra recolhido foi medido e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se uma agitação e deixando a mistura em repouso por 30 min para a separação das fases por 6 ciclos. A fase superior era composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à evaporação em rota-evaporador (Da Rós, 2009).

3.2.13. Quantificação dos Mono-ésteres de Etila (Biodiesel) Formados por Cromatografia de Fase Gasosa

Os mono-ésteres de etila formados foram quantificados por cromatografia de fase gasosa (Cromatógrafo a gás, Varian 3800), com detector de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável 5% DEGS em Chromosorb WHP, 80/100 mesh - Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA, de acordo com metodologia descrita por Urioste et al.(2008). Na Tabela 3.5 são apresentadas as condições para a quantificação dos mono-ésteres de etila produzidos.

Tabela 3.5. Condições para determinação dos mono-ésteres de etila produzidos.

Padrão interno	Hexanol (16,26 g.L ⁻¹)	
Temperaturas	Coluna: 120 °C por 10 min e 170 °C por 13 min a uma taxa de 25 °C.min ⁻¹ , totalizando 25 min de análise.	
	Ionizador e detector: 190 °C	
Gás de arraste	Nitrogênio (30 mL.min ⁻¹)	
	Padrão interno (hexanol)	1,17
	C ₈	4,13
	C ₁₀	8,26
	C ₁₂	10,77
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila (min)	C ₁₄	12,31
	C ₁₆	15,04
	C ₁₈	20,96
	C _{18:1}	23,57
	C _{18:2}	26,83

3.2.14. Análise de Viscosidade das Amostras de Biodiesel

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas a 25 °C, empregando 0,5 mL de fluido. Os dados obtidos (viscosidade, taxa de deformação e tensão de cisalhamento) foram ajustados de acordo com a lei de potência (equação 3.11), conforme descrito por Freitas et al. (1998).

$$T = K\gamma^n \quad (3.11)$$

Em que: T é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de deformação aplicada, n é o valor do coeficiente angular e K é o índice de consistência.

3.2.15. Cálculo do Rendimento de Transesterificação

O rendimento de transesterificação foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação a massa teórica esperada de ésteres de etila (M_e). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo vegetal (babaçu ou palma) (M_0), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela Equação 3.12a, em que M_0 corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) (Equação 3.12b). O rendimento foi calculado utilizando a massa total de ésteres obtida pela análise por cromatografia gasosa (M_t) pela massa teórica de ésteres de etila (M_e), conforme mostrado na Equação 3.12c.

$$M_e = \frac{(M_0 \cdot MM_e)}{MM_a} \quad (a) \quad M_0 = C_a \cdot M_i \quad (b) \quad (c) \quad R = \frac{M_t}{M_e} \cdot 100 \quad (3.12)$$

3.2.16. Cálculo da Produtividade

O cálculo da produtividade foi realizado pela relação da massa de biodiesel produzido pelo tempo de reação e a massa de enzima imobilizada empregada na transesterificação, conforme mostrado pela equação 3.13.

$$P = \frac{m_{biodiesel}}{t \cdot m_{PI}} \quad (3.13)$$

Em que: P é a produtividade ($\text{mg}_{biodiesel} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}_{PI}$); $m_{biodiesel}$ é a massa de biodiesel produzida na reação (mg); t é o tempo de reação (h) e m_{PI} é a massa de proteína imobilizada empregada na reação de transesterificação (mg).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos neste trabalho. Conforme proposto inicialmente, foram preparados diferentes derivados imobilizados de lipases, variando-se a fonte da enzima, o procedimento de imobilização (covalente ou adsorção física), o tipo de suporte, a ativação destes suportes e as condições de imobilização, visando obter derivados estáveis e ativos para mediar a síntese de biodiesel a partir dos óleos de babaçu e de palma pela rota etílica. Estes derivados foram inicialmente caracterizados quanto à concentração de lipase imobilizada, atividade da enzima imobilizada, conversão em butirato de butila, atividade recuperada medida na hidrólise de azeite de oliva e estabilidade térmica.

Foram estudados seis tipos de preparações de lipases oriundas de fonte microbiana, incluindo *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Pseudomonas fluorescens* (LPF), *Candida antarctica* do tipo B (CALB), Lipex[®] 100L (fonte não informada) e *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2) e de tecido de células animais como lipase de pâncreas de porco (LPP).

Essas enzimas foram imobilizadas covalentemente nos suportes orgânicos agarose 6BCL, agarose 10BCL, sepabeads, complexos polieletrólíticos de quitosana: quitosana pura, quitosana-alginato, quitosana-PVA, quitosana- κ -carragenina e quitosana-gelatina, modificados ou não quimicamente com TNBS, quitosana-alginato modificada com laurinaldeído e amino-toyopearl, ativados com glicidol, epicloridrina e glutaraldeído.

Além da imobilização covalente multipontual em suportes macroporosos, foi também testada a imobilização das lipases por adsorção física nas matrizes hidrofóbicas octil-agarose 4BCL, hexil-toyopearl, octadecil-sepabeads e poli-hidróxibutirato (PHB), este último nas formas em pó e granular. Os resultados dos testes de imobilização covalente são apresentados no item 4.1 e os da imobilização por adsorção apresentados no item 4.2. No item 4.3 é apresentado um quadro comparativo das propriedades de todos os derivados enzimáticos preparados, destacando as possíveis aplicações para os diferentes derivados. Baseando-se nessa discussão, foram selecionados os derivados mais estáveis termicamente para serem testados na etanolise de óleos vegetais. Finalmente, no item 4.4 são apresentados e discutidos os resultados obtidos na síntese de biodiesel com os derivados selecionados.

4.1. Imobilização Covalente Multipontual de Lipases em Suportes previamente Ativadas

4.1.1. Suporte Agarose 6BCL: Imobilização de Lipase de Pâncreas de Porco (LPP) em Gel de Agarose 6BCL

A literatura indica que agarose é o suporte que fornece o maior aumento na estabilidade térmica do derivado imobilizado devido à sua grande área superficial, regularidade dos poros e excelente congruência geométrica com a proteína (Tardioli, 2003 a,b). Contudo, isso somente ocorre se a imobilização for realizada em pH superior a 10, pois a formação de várias ligações entre a enzima e o suporte requer que vários grupos amino da proteína estejam desprotonados e, portanto, disponíveis para reagir com os grupos aldeídos do suporte. Resíduos lisina, normalmente abundantes na superfície da enzima, são responsáveis pela formação de enlaces com o suporte, mas como possuem pKa em torno de 10,5, só estarão disponíveis para a reação em pH superior a 10.

A primeira preparação enzimática testada foi a lipase de pâncreas de porco (LPP). Essa preparação enzimática possui um custo relativamente inferior às outras lipases por conter em sua formulação enzimas contaminantes tais como colesterol esterase, proteases (tripsina e quimotripsina) e outras hidrolases (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998).

A imobilização da LPP em agarose ativada foi conduzida em tampão bicarbonato pH 10,05, oferecendo-se 5,00 mg de proteína.g⁻¹ de gel (item 3.2.8.5). A ativação do suporte com glutaraldeído promoveu maior rendimento de imobilização (4,4 mg proteína desaparecida do sobrenadante) do que as ativações glioxil, com glicidol e epiclorigrina (~2,00 mg de proteína). Entretanto, os derivados obtidos não apresentaram atividade hidrolítica devido à baixa estabilidade da enzima no pH de imobilização. A enzima incubada em tampão bicarbonato pH 10,05 foi totalmente inativada após 5 h de incubação, mostrando que essa preparação enzimática possui baixa estabilidade em pH de imobilização (10,05), como mostrado na Figura 4.1. Algumas estratégias foram empregadas para proteger o sítio ativo da enzima, reduzindo a inativação pelo pH altamente alcalino, tais como adição à solução de enzima de íons cálcio, polietilenoglicol (PEG-1500), ácido butírico, glicerol, Triton X-100 e íons cálcio com estabilizante PEG-1500, segundo indicações descritas nos trabalhos publicados por Sharma et al. (2001) e Soares et al. (2003). Contudo, o perfil de inativação da LPP na presença ou ausência desses agentes estabilizantes foi bastante similar.

Desta forma, foi testada outra estratégia, verificando, o tipo de tampão, sendo utilizado o tampão borato em pH 10,05 (50 mM). A enzima incubada neste tampão mostrou-se mais estável, inativando-se completamente somente após 10 h de incubação. Entretanto, trabalhos relatados na literatura mostram que esse tampão também não é indicado para imobilizar multipontualmente enzimas em géis glioxil, pois os íons borato podem formar complexos com os grupos glioxil do suporte, o que impede as multi-interações entre enzima e suporte (Álvaro et al., 1990).

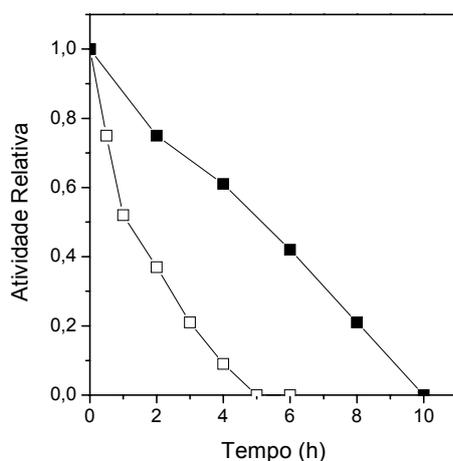


Figura 4.1. Estabilidade alcalina da lipase LPP em tampão bicarbonato pH 10,05 (□) e em tampão borato (■).

Desta forma, não foi possível obter derivados de LPP com atividade catalítica imobilizada em gel glioxil-agarose devido à sua baixa estabilidade em pH alcalino. A imobilização de LPP por ligação covalente somente pode ser realizada sem perda significativa de atividade em pH próximo à neutralidade (Desai et al., 2006; Paula et al., 2007).

4.1.2. Suporte Agarose 6BCL: Imobilização de Lipases Microbianas (LTL, LPF, Lipex[®] 100L e CALB)

Na impossibilidade da imobilização covalente multipontual da LPP em gel glioxil-agarose, na seqüência, foram testadas lipases de fonte microbiana tais como *T. lanuginosus* (LTL), *P. fluorescens* (LPF), Lipex[®] 100L e *C. antarctica* (CALB).

De acordo com o catálogo informativo fornecido pela Novozymes, as preparações de lipases LTL e Lipex[®] 100L são utilizadas industrialmente na formulação de detergentes por possuírem elevada estabilidade nas condições de lavagem (meio alcalino). Lipases CALB e LPF são também enzimas de elevada estabilidade alcalina e que já vinham por isso sendo empregadas para a imobilização multipontual em géis glioxil (Palomo et al., 2004; Palomo et al., 2005; Brígida et al., 2007; Rodrigues et al., 2008). No item 4.1.2.1 são apresentados os resultados da cinética de imobilização das lipases microbianas em agarose ativada com glicidol, epiclorigrina e glutaraldeído e a influência do tempo de imobilização nas propriedades dos derivados enzimáticos obtidos, preparados de acordo com o protocolo descrito no item 3.2.8.6.

4.1.2.1. Cinética de Imobilização e Influência do Tempo de Imobilização de Lipases Microbianas em Gel de Agarose

Na imobilização covalente multipontual de proteínas o tempo de imobilização é uma variável importante, pois os enlaces entre grupos reativos da enzima e grupos reativos do suporte é um processo lento, já que a enzima tem que se realinhar para que seus grupos reativos se aproximem do suporte (Pedroche et al., 2007; Rodrigues et al., 2008). Assim, era importante não apenas acompanhar o desaparecimento da enzima do sobrenadante ao longo do tempo determinando o tempo mínimo para ocorrer a imobilização da máxima quantidade possível de proteína por grama de suporte ativado (cinética de imobilização), mas também investigar o efeito do tempo de incubação adicional nas propriedades catalíticas dos derivados de LTL, LPF, CALB e Lipex[®] 100L obtidos pela imobilização em gel de agarose 6BCL ativado com glicidol, epiclorigrina e glutaraldeído.

As imobilizações foram conduzidas em tampão bicarbonato pH 10,05 (100 mM) na presença de Triton X-100 (0,15%), conforme descrito no item 3.2.8.5. A estratégia de utilizar Triton X-100 durante a imobilização foi para clivar agregados de lipase, pois essa classe de enzima tende a agregar-se por interação hidrofóbica entre as regiões do sítio ativo (tampa hidrofóbica) (Palomo et al., 2003). Na ausência de Triton X-100, duas moléculas de lipase podem ser imobilizadas, porém apenas 1 molécula interage covalentemente com o

suporte e a outra se encontra adsorvida ao sítio ativo da lipase imobilizada covalentemente (Palomo et al., 2005). Entretanto, para a CALB, não é esperado esse benefício adicional pela presença de Triton X-100, tendo em vista que essa particular preparação de lipase não sofre agregação bimolecular por não possuir esta tampa hidrofóbica que cobre o sítio ativo (Palomo et al., 2003; Palomo et al., 2005). Para efeito de comparação, contudo, todas as preparações de lipases microbianas foram imobilizadas empregando as mesmas condições.

A concentração de grupos aldeído glioxil presente na superfície da agarose após a etapa de ativação com glicidol e epiclorigrina foi de $84,0 \pm 5,0$ e $79,0 \pm 4,0 \mu\text{moles.g}^{-1}$ de suporte, respectivamente, conforme determinado pelo método descrito no item 3.2.6.7.

Nas Figuras 4.2 (A, B, C e D) são mostradas as cinéticas de imobilização das lipases LTL (A), LPF (B), Lipex[®] 100L (C) e CALB (D) em agarose ativada com glicidol (GLI), epiclorigrina (EPI) e glutaraldeído (GLU), bem como a atividade do controle (enzima solúvel). A atividade enzimática desaparecida foi fortemente influenciada pelo tipo de agente de ativação empregado.

Em 30 min de imobilização, aproximadamente 80% da atividade enzimática oferecida, havia desaparecido do meio de imobilização, atingindo 100% após 1 h de reação. A imobilização de enzimas em matrizes ativadas por glutaraldeído é mais rápida se comparada com outros agentes devido à sua elevada reatividade em pH alcalino.

Na ativação via glicidol e epiclorigrina, os aldeídos gerados na etapa de ativação (grupos glioxil) são menos reativos que os aldeídos de glutaraldeído. Esses grupos glioxil só reagem com os grupos amino dos resíduos lisina da enzima (Guisan, 1988; Palomo et al., 2005), enquanto o glutaraldeído pode reagir também com outros grupos reativos da enzima, como grupos hidroxilas e sulfetos (Manrich et al., 2008). Esses fatores explicam a maior velocidade de imobilização na ativação glutaraldeído que a ativação glioxil. A velocidade de imobilização com suportes glioxil é também uma indicação do número de lisinas disponíveis na superfície da proteína, quanto maior o número de resíduos lisina maior a velocidade de imobilização.

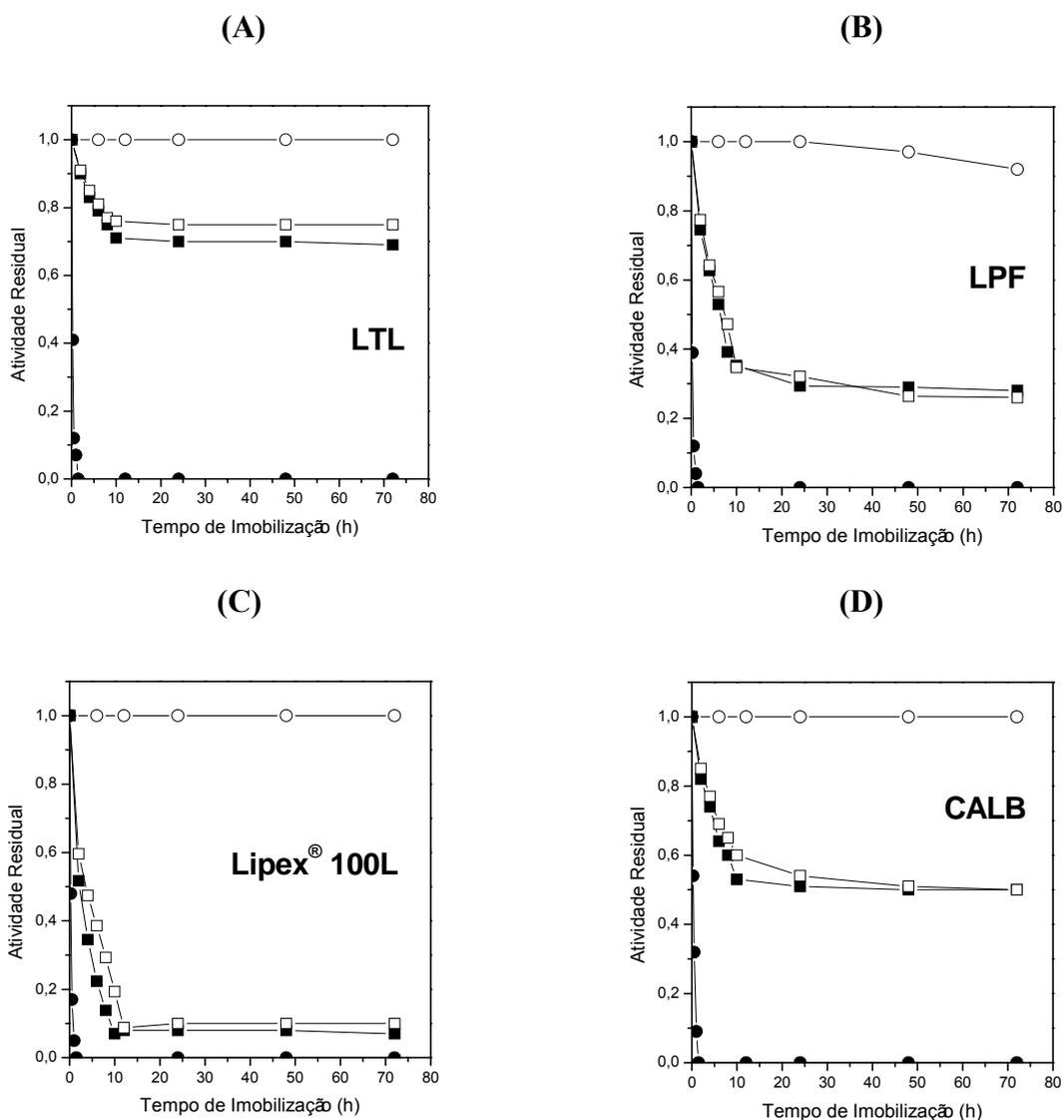


Figura 4.2. Desaparecimento de atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização das lipases LTL (A), LPF (B), Lipex[®] 100L (C) e CALB (D) empregando como suporte gel de agarose ativado por glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●) em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,05 na presença de 0,15% de Triton X-100 a 25 °C. Carga de proteína oferecida de 5 mg.g⁻¹ de gel e a atividade da solução enzimática nas condições de imobilização (solução controle (○)).

Além disso, na imobilização das lipases em glioxil-agarose ativada com glicidol e epicloridrina verifica-se que no sobrenadante, uma atividade residual constante ao longo do tempo, sendo que Lipex[®] 100L, apresentou a maior velocidade de desaparecimento de proteína no sobrenadante, revelando atividades residuais próximas de zero (cerca de 90% desaparece). Uma vez que todas as enzimas solúveis são estáveis nas condições de

imobilização (apenas LPF mostrou ligeira queda para longos tempos de incubação), toda a proteína desaparecida deve estar imobilizada no gel.

Todas as outras três lipases testadas possuem baixa concentração de resíduos lisina, como por exemplo, lipase CALB possui nove resíduos lisina (Rodrigues et al., 2008), seguido de LPF (sete resíduos) (Palomo et al., 2005) e LTL (sete resíduos) (Derewenda et al., 2005). A concentração de resíduos lisina na estrutura de Lipex[®] 100L não é relatada em nenhuma das bases de dados consultadas. Uma vez que essa enzima apresentou a maior velocidade de imobilização em agarose glioxil, com desaparecimento de toda a proteína oferecida, supõe-se que deva ter um número maior de resíduos lisina.

Após a imobilização, as propriedades catalíticas dos derivados foram determinadas, conforme mostrado na Tabela 4.1. Os menores valores de atividade hidrolítica (AH) foram obtidos para as lipases LPF e CALB. Sabe-se que a enzima CALB possui baixa especificidade na hidrólise de triacilgliceróis por se tratar de uma “falsa” lipase, ou seja, esta enzima é considerada por alguns autores uma esterase e possui maior atividade catalítica na hidrólise de monoésteres (Salis et al., 2003). Lipase LPF possui alta atividade catalítica na hidrólise de triacilgliceróis (Moreira et al., 2007). No entanto, os seus derivados apresentaram baixa atividade enzimática quando imobilizados em gel de agarose. Essa lipase é comercializada na forma de pó e a concentração de proteína contida na formulação enzimática é de 20 mg.g⁻¹ de pó. Normalmente, as preparações enzimáticas comercializadas na forma de pó contêm agentes protetores, tais como lactose e outros veículos que protegem a enzima durante o processo de liofilização (Klibanov, 2001). Possivelmente, após a imobilização, a concentração destes agentes protetores no microambiente da enzima é menor, o que pode ter reduzido a atividade catalítica do derivado. A atividade da enzima solúvel é medida na presença dessas substâncias, as quais não estarão presentes para proteger a enzima imobilizada, pois o derivado é submetido a sucessivas lavagens e por este motivo a atividade hidrolítica dos derivados de LPF foi baixa.

A estabilidade térmica da enzima também é influenciada pela presença de agentes protetores: na forma solúvel ela se encontra na presença de protetores e na forma imobilizada na ausência deles. Assim, embora o fator de estabilidade obtido seja em torno de 10, em realidade talvez deva ser muito maior, empregando como base de comparação a enzima imobilizada com a enzima solúvel dialisada, na ausência de protetores.

Tabela 4.1. Influência do tempo de imobilização sobre as propriedades catalíticas de CALB, LTL, LPF e Lipex® 100L imobilizadas em gel de agarose 6BCL ativada por diferentes protocolos. Carga oferecida de 5 mg de proteína.g⁻¹ de gel. Atividade oferecida: LTL (1256 U.g⁻¹ de gel); LPF (1087,5 U.g⁻¹ de gel); CALB (398,0 U.g⁻¹ de gel); Lipex® 100L (1592,5 U.g⁻¹ de gel).

Lipase (fonte)	Agente de Ativação	Tempo de imobilização (h)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	t _{1/2} (h)	FE	
CALB	GLI	24	64,7	2,03	40,0	1,61	23,0	
		48	52,9	2,27	30,0	1,50	21,4	
		72	41,2	2,17	23,8	1,54	22,0	
	EPI	24	58,8	2,15	34,4	1,26	18,0	
		48	52,9	2,05	22,5	1,40	20,0	
		72	41,2	2,28	19,0	1,57	22,5	
	GLU	24	35,3	5,00	8,90	1,05	15,0	
		48	35,3	5,00	8,90	1,19	17,0	
		72	29,4	5,00	7,40	1,40	20,0	
LTL	GLI	4	238,6	0,95	100	12,1	151,0	
		12	321,5	1,28	100	19,4	242,0	
		24	319,5	1,34	95,4	23,4	291,0	
		48	290,8	1,32	87,7	26,3	329,0	
		72	271,3	1,35	81,8	19,4	277,0	
	EPI	4	228,6	0,91	100	11,5	144,0	
		12	273,8	1,09	100	18,6	232,0	
		24	297,6	1,25	96,0	22,1	276,0	
		48	279,5	1,25	89,0	23,6	295,0	
		72	270,2	1,32	81,5	21,7	271,0	
	GLU	24	117,0	5,00	10,2	16,5	206,0	
		48	129,3	5,00	10,3	17,7	221,0	
		72	105,8	5,00	8,42	16,6	208,0	
	LPF	GLI	24	66,0	3,53	8,60	0,33	7,80
			48	64,6	3,34	6,33	0,31	7,40
72			58,8	3,40	5,70	0,29	6,90	
EPI		24	59,0	3,25	8,30	0,31	7,40	
		48	58,8	3,00	6,43	0,37	8,70	
		72	52,9	3,15	5,51	0,35	8,40	
GLU		24	40,0	5,00	5,20	0,29	6,80	
		48	40,0	5,00	5,20	0,27	6,50	
		72	42,4	5,00	5,60	0,30	7,00	
Lipex® 100L	GLI	24	253,0	4,84	16,4	0,55	6,10	
		48	235,2	4,78	15,5	0,60	6,70	
		72	211,7	4,80	13,9	0,67	7,50	
	EPI	24	244,0	4,50	17,0	0,58	6,50	
		48	231,1	4,44	15,7	0,58	6,40	
		72	217,0	4,47	14,6	0,81	9,00	
	GLU	24	92,0	5,00	5,80	0,42	4,70	
		48	75,0	5,00	4,71	0,38	4,20	
		72	77,5	5,00	4,30	0,36	4,00	

Com relação à baixa atividade recuperada, é que durante a incubação na ausência das altas concentrações desses protetores, a enzima fica sujeita à formação de grande número de ligações com o suporte no processo de multi-interação, resultando em graves distorções do sítio ativo para a maioria das moléculas de enzima imobilizada. As baixas atividades recuperadas de todas as lipases imobilizadas no suporte ativado com glutaraldeído corroboram essa hipótese, já que a grande reatividade de glutaraldeído normalmente resulta em número excessivo de ligações, com distorção de sítio ativo. Diferentes aminoácidos presentes na superfície da enzima podem reagir com os grupos aldeído do glutaraldeído, acarretando uma má orientação da enzima durante a imobilização (imobilização randômica) e que pode distorcer a enzima (Manrich et al., 2008). Tal reatividade também pode gerar uma superfície interna com menor diâmetro de poros durante a ativação se comparada com os agentes epóxidos (glicidol e epicloridrina).

Dentre os derivados preparados, LTL imobilizada em gel glioxil-agarose ativadas por glicidol e epicloridrina apresentaram os valores mais elevados de atividade hidrolítica, da ordem de 319,5 e 297,6 U.g⁻¹ de gel, respectivamente, seguidos dos derivados de Lipex[®] 100L ativados por estes mesmos agentes (253,0 e 244,0 U.g⁻¹ de gel), imobilizados em 24 h.

Os derivados glioxil de LTL apresentaram atividades recuperadas superiores a 95%, ou seja, quase toda a atividade desaparecida durante a imobilização foi medida no derivado, enquanto na ativação do suporte com glutaraldeído apenas 10,2% da atividade desaparecida foi medida no derivado.

A grande reatividade do glutaraldeído permitiu imobilizar toda a proteína oferecida, para as quatro lipases testadas. Para os derivados preparados em suporte modificados por ativação glioxil (glicidol e epicloridrina), Lipex[®] 100L foi quase totalmente imobilizada, acima de 90%, lipase LPF em torno de 70%, CALB apenas 40% e o menor rendimento de imobilização foi observado para a lipase LTL, cerca de 20% (1,03-1,30 mg proteína.g⁻¹ de gel). Os resultados obtidos para CALB imobilizada em gel glioxil-agarose confirmam os dados anteriormente publicados (Rodrigues et al., 2008). Uma possível explicação para as diferentes porcentagens de proteína imobilizada pode ser creditada às diferentes estruturas e massas moleculares das lipases testadas. CALB, LTL e LPF são preparações de lipases conhecidas e empregadas em processos de imobilização. Porém dados referentes à preparação Lipex[®] 100L não são encontrados na literatura e a empresa que

comercializa esta enzima (Novozymes) não disponibilizou nenhuma informação sobre esta preparação enzimática, o que dificulta a comparação com os dados obtidos para as outras enzimas.

Em termos de estabilização térmica, os derivados de Lipex[®] 100L e LPF foram pouco estáveis, apenas de 4,0 a 9,0 vezes mais estáveis que a enzima solúvel. Uma vez que essa enzima possui em sua estrutura química sete resíduos lisina, é possível que o problema seja a comparação da estabilidade da enzima imobilizada na ausência de protetores e da solúvel na presença, conforme discutido anteriormente. O processo de imobilização da preparação enzimática Lipex[®] 100L em gel glioxil-agarose também não forneceu derivados termoestáveis. Informações sobre a origem e a elucidação de estrutura química, bem como a concentração de resíduos lisina, não é relatada na literatura. Lipase de *Candida antarctica* (CALB) foi estabilizada entre 15 a 23 vezes e os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com dados anteriores obtidos no grupo (Rodrigues et al., 2008). Esta enzima possui em sua estrutura nove resíduos lisina, o que deve ter favorecido interações multipontuais entre a enzima e o suporte. A imobilização de LTL em glioxil-agarose forneceu derivados com máxima estabilização térmica. Para os derivados preparados em suportes ativado com glicidol e epícloridrina, o fator de estabilização obtido para a LTL imobilizada em 24 h foi de 291,0 e 276,0, respectivamente, valores ligeiramente superiores ao derivado preparado em suporte ativado com glutaraldeído, com um fator de estabilização da enzima da ordem de 206,0 vezes. Essa enzima possui sete resíduos lisina em sua estrutura química e apesar da similar concentração em relação à LPF e CALB foi possível obter derivados mais termoestáveis, o que pode ser atribuído a uma distribuição mais favorável dos resíduos lisina na superfície desta lipase, que favoreceu a formação de uma estrutura rígida e ativa.

Neste estudo também foi avaliado o efeito do tempo de imobilização sobre as propriedades catalíticas das lipases microbianas imobilizadas em gel de agarose ativado por diferentes protocolos. O tempo de imobilização variou de 4 a 72 h, para os derivados de LTL preparados por ativação glioxil (glicidol e epícloridrina) e de 24 a 72 h para os demais derivados. Sabe-se que o aumento do tempo de imobilização favorece novas interações entre o complexo enzima-suporte, reduzindo a flexibilidade da enzima e, conseqüentemente, aumentando a estabilidade térmica dos derivados (Pedroche et al., 2007; Rodrigues et al., 2008). Em conseqüência, perda da atividade catalítica da enzima pode ser verificada devido às mudanças conformacionais de sua estrutura ativa durante o processo de regidificação do

complexo enzima/suporte (Pedroche et al., 2007; Rodrigues et al., 2008). Esse fenômeno foi claramente observado na imobilização de LTL em agarose glioxil e em menor proporção para CALB, essas duas enzimas tiveram os maiores fatores de estabilização. No suporte ativado com glutaraldeído a reação foi muito rápida, não sendo notada a influência do tempo de incubação para nenhuma preparação de lipase testada.

Para as lipases Lipex[®] 100L e LPF a perda de atividade após longo período de incubação não foi significativa porque não ocorreu aumento da estabilidade dos derivados, visto que a estabilização térmica destes derivados foi inferior a 10 vezes.

Os perfis de inativação dos vários derivados LTL obtidos são mostrados na Figura 4.3 (A-C). Ajustou-se aos dados experimentais um modelo de decaimento não-linear de primeira ordem visando-se determinar os tempos de meia-vida da enzima solúvel e dos biocatalisadores preparados e, assim, determinar o fator de estabilidade em relação à enzima solúvel (Sadana e Henley, 1987).

Dentre os agentes de ativação testados, glicidol permitiu maior estabilização, entre 151,0 e 329,0 em relação à enzima solúvel (Figura 4.3A). O tempo de meia-vida da enzima aumentou de 12,1 para 23,4 h (FE=291), com o aumento do tempo de imobilização de 4 para 24 h. Aumentando o tempo de imobilização para 48 h, o tempo de meia-vida do biocatalisador aumentou para 26,3 h (FE=329). No entanto, aumentando o tempo de imobilização para 72 h, a estabilização foi reduzida para 277,0 vezes, valor inferior à enzima imobilizada em 24 h. Este comportamento de decaimento da estabilização térmica de derivados imobilizados por longo período de incubação é também relatado na literatura para outras enzimas (Tardioli et al., 2003a; Becaro, 2008).

Tardioli et al. (2003a) relataram que a carboxipeptidase A (CPA) imobilizada em gel glioxil-agarose ativado por glicidol apresentou máxima estabilização térmica em 48 h, 260 vezes mais estável que a enzima solúvel, e em 72 h, sua estabilização foi inferior a 160,0. Esses autores creditaram esse comportamento a rigidificação da enzima para tempos superiores a 48 h, acarretando uma forte distorção da enzima e inativação por influência da temperatura. Similar comportamento foi verificado para D-hidantoinase imobilizada em gel glioxil-agarose em 72 h (Becaro, 2008).

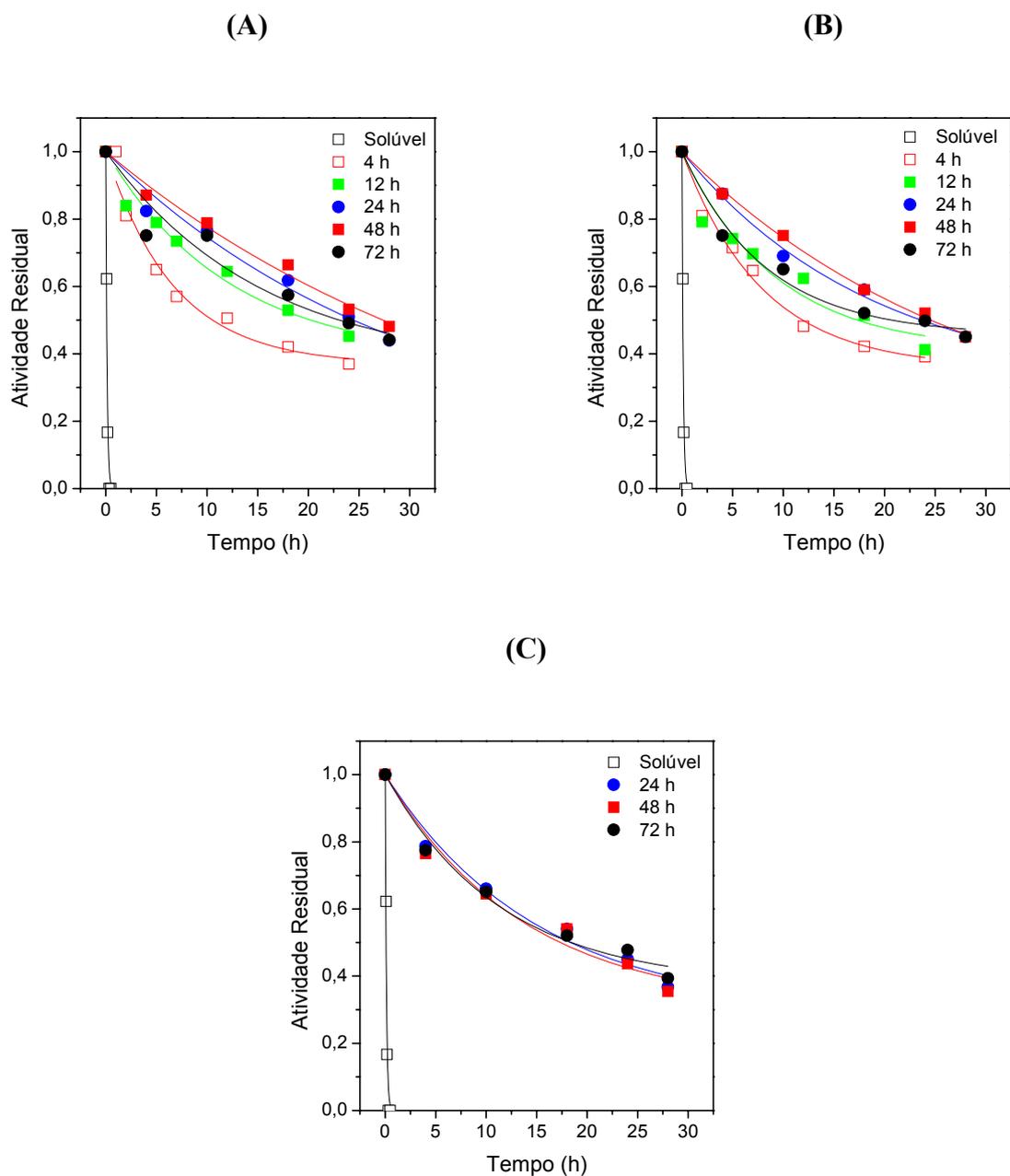


Figura 4.3. Perfil de inativação térmica de LTL imobilizada em gel glioxil-agarose ativado por glicidol (A), epicloridrina (B) e glutaraldeído (C) a 70 °C em tampão fosfato pH 8,0 100 mM.

Na Figura 4.3B são mostrados os perfis de inativação térmica da LTL imobilizada em agarose ativada por epicloridrina. Os fatores de estabilidade obtidos para estes derivados foram ligeiramente inferiores aos obtidos em suporte ativados com glicidol. A máxima estabilização térmica foi obtida em 48 h (FE=295). O aumento do tempo de imobilização para 72 h também reduziu a estabilidade térmica de LTL imobilizada em glioxil-

agarose ativada com epícloridrina. Para os derivados imobilizados em gel glioxil-amino-glutaraldeído, os fatores de estabilidade oscilaram entre 208,0 a 221,0 e os tempos de meia-vida foram próximos a 17 h, como mostrado na Figura 4.3C. O aumento do tempo de imobilização de 24 h para 48 h não aumentou a estabilização da enzima (FE = 221,0). Para a enzima imobilizada em 72 h, a estabilização do derivado sofreu uma pequena redução (FE= 208,0). Derivados preparados em suportes ativados com glutaraldeído são menos estáveis termicamente quando comparados com suportes ativados por outros agentes de ativação (Adriano et al., 2008). Quimotripsina foi imobilizada em géis de quitosana e em complexos polieletrólíticos de quitosana e a estabilização da enzima foi maior para os suportes glioxil ativados com glicidol e epícloridrina, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

De acordo com os perfis de inativação apresentados, o aumento do tempo de imobilização de 24 h para 48 h não promoveu um aumento significativo na estabilização dos derivados de LTL preparados em suporte ativado com glicidol e epícloridrina. O derivado obtido em suporte ativado com glutaraldeído também não sofreu influência do tempo de imobilização. Para as outras lipases testadas o mesmo efeito foi verificado. Por este motivo, as imobilizações para a estimativa da capacidade máxima de proteína imobilizada foram realizadas em 24 h para todas as lipases testadas no presente trabalho tais como LTL, Lipex[®] 100L, LPF e CALB.

Diante desses resultados, o tempo ideal de imobilização de LTL foi de 24 h, tendo em vista que não houve aumento significativo do fator de estabilidade após 24 h. Além disso, para as quatro lipases testadas não foi observado melhoria significativa em nenhum dos parâmetros de imobilização para tempos de imobilização superiores a 24 h e por esse motivo, foi estabelecido o tempo de imobilização de 24 h para todas as lipases testadas.

4.1.2.2. Efeito da Concentração de Proteína oferecida sobre as Propriedades Catalíticas dos Derivados de Agarose Ativados por Diferentes Protocolos

A principal variável investigada neste item foi a carga máxima de proteína que pode ser imobilizada por grama de suporte, utilizando diferentes protocolos de ativação. O protocolo de ativação pode alterar tanto a estrutura interna do gel quanto a concentração de

grupos reativos no suporte, afetando, conseqüentemente, o rendimento de imobilização e as propriedades bioquímicas e cinéticas da enzima imobilizada. A concentração de enzima na solução de imobilização (carga enzimática oferecida) também pode afetar a distribuição da enzima imobilizada no suporte. Estudos reportados na literatura concluíram que quanto mais concentrada a solução de imobilização mais heterogênea a distribuição interna da enzima imobilizada, que tende a se acumular nas camadas mais superficiais da partícula de suporte ativado, o que interfere tanto na quantidade de enzima imobilizada quanto na atividade imobilizada medida (Rodrigues et al., 2008). Evidentemente, as propriedades da enzima tais como massa molecular, quantidade e distribuição de regiões hidrofóbicas na superfície da enzima, número de resíduos da enzima que podem reagir com o suporte e o protocolo de ativação utilizado também podem influenciar nesses parâmetros.

Dentre as preparações de lipases empregadas, LTL foi a preparação que forneceu derivados com maiores valores de atividade hidrolítica e atividade recuperada (Tabela 4.2). Nos ensaios conduzidos com o menor carregamento de proteína (5 mg.g^{-1} de gel), a recuperação de atividade com os derivados preparados com suportes ativado via glicidol e epicloridrina foi superior a 95%, ou seja, praticamente toda a enzima desaparecida do sobrenadante estava ativa no suporte de imobilização. O derivado preparado em agarose ativado com glutaraldeído apresentou atividade hidrolítica quase três vezes menor ($117,0 \text{ U.g}^{-1}$ de gel). Para os ensaios conduzidos com o carregamento de 80 mg.g^{-1} de gel, a atividade hidrolítica dos derivados obtidos em suportes ativado com glicidol e epicloridrina foram aproximadamente duas vezes maior que os derivados preparados em suporte ativado com glutaraldeído. Entretanto, os derivados preparados por ativação glutaraldeído apresentaram maior porcentagem de proteína imobilizada. Para suportes ativado com glutaraldeído, carregamentos de até 10 mg.g^{-1} de gel, forneceram valores de 100% de imobilização da proteína oferecida. A máxima concentração de enzima imobilizada em agarose foi de $27,8 \text{ mg.g}^{-1}$ de gel. Quanto aos derivados em suportes ativado com glicidol e epicloridrina, a máxima concentração de enzima imobilizada foi de 21,2 e 19,4 mg.g^{-1} de gel, respectivamente, oferecendo 80 mg.g^{-1} de gel.

Tabela 4.2. Parâmetros de imobilização da LTL em agarose ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.

CP (mg.g ⁻¹)	Glicidol			Epícloridrina			Glutaraldeído		
	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)
5	319,5	1,34	95,5	297,6	1,25	96,0	117,0	5,00	10,2
10	703,4	4,14	67,6	560,6	3,89	57,4	227,5	10,0	9,05
30	1246,6	12,7	39,1	1113,9	12,1	36,6	611,5	25,1	9,70
60	1390,4	17,9	30,9	1335,5	17,0	31,3	640,8	26,3	9,70
80	1347,3	21,2	25,4	1470,0	19,4	30,2	703,7	27,8	10,1

CP: Carregamento de proteína oferecida (mg de proteína.g⁻¹ de gel); A_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%).

É importante ressaltar que ao final de 72 h de incubação em tampão bicarbonato pH 10,05 não houve perda da atividade enzimática e, conseqüentemente, a enzima que não foi imobilizada, presente no sobrenadante após a imobilização, pode ser reutilizada para uma nova imobilização ou ser utilizada para outros fins, pois elas se mostraram estáveis nas condições de imobilização.

A Tabela 4.3 mostra os resultados obtidos para a LPF imobilizada em agarose ativada por diferentes protocolos. Observa-se que foram obtidos derivados com baixa atividade de hidrólise se comparados com os derivados de LTL imobilizados nesta mesma matriz. A máxima atividade hidrolítica obtida para esta lipase foi de aproximadamente 200 U.g⁻¹ de gel, com carregamento de 80 mg.g⁻¹ de gel, empregando glicidol como agente de ativação (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Parâmetros de imobilização da LPF em agarose ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.

CP (mg.g ⁻¹)	Glicidol			Epícloridrina			Glutaraldeído		
	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)
5	66,0	3,53	8,60	59,0	3,25	8,30	40,0	3,81	5,20
10	96,0	7,49	5,90	101,0	6,00	7,80	68,1	7,91	4,50
30	138,0	11,0	5,70	128,0	9,42	6,20	83,4	11,9	4,00
60	177,0	13,3	6,10	164,7	11,1	6,20	100,1	16,0	3,30
80	198,0	12,2	7,40	180,1	11,0	7,50	130,2	17,2	4,00

CP: Carregamento de proteína oferecida (mg de proteína.g⁻¹ de gel); A_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%).

As atividades hidrolíticas dos derivados de LTL foram aproximadamente 6-7 vezes superiores aos derivados de LPF. Do ponto de vista de rendimento de imobilização e atividade recuperada, a influência do protocolo de ativação foi similar ao observado para a LTL. O gel ativado por glutaraldeído favoreceu a imobilização de uma maior concentração de proteína, da ordem de $17,2 \text{ mg.g}^{-1}$ de gel. Nos géis glioxil ativados via glicidol e epiclоридrina, a máxima concentração de proteína imobilizada foi de $12,2$ e $11,1 \text{ mg.g}^{-1}$ de gel, respectivamente, para um carregamento de 80 mg.g^{-1} de gel. A atividade recuperada e atividade hidrolítica dos derivados de LPF foram bastante inferiores aos da LTL, decorrente da presença de possíveis contaminantes presentes na formulação enzimática, conforme já discutido no item 4.1.2.1.

Os resultados da Tabela 4.3 indicam que para a LPF, com o oferecimento de 60 mg de proteína. g^{-1} de gel a matriz já se mostrava perto da saturação (relação volume de solução/massa de suporte de 10:1, valor fixado para todos os testes de imobilização). Verifica-se ainda um pequeno incremento da atividade medida no gel quando o carga de proteína oferecida foi aumentada de 60 mg para 80 mg.g^{-1} de gel, embora a concentração de proteína imobilizada não tenha aumentado, ocorrendo até redução dependendo do agente de ativação empregado. A repetição desse padrão indica que as maiores atividades imobilizadas medidas para 80 mg podem ser devidas a uma distribuição heterogênea, com maior concentração de enzima na superfície do gel e, conseqüentemente, efeitos difusivos internos menos severos. Assim, para LPF, os resultados sugerem não haver vantagem em se oferecer cargas maiores que 60 mg de proteína. g^{-1} de gel.

Os resultados obtidos para a Lipex[®] 100L indicam que há um aumento significativo na massa de proteína imobilizada quando se aumenta a carga oferecida de 30 para 80 mg de proteína (aumento em cerca de 70%), observando-se também aumento de cerca de 30% na atividade hidrolítica da enzima imobilizada, para a carga de 80 mg imobilizada em agarose ativada por diferentes protocolos. A máxima atividade hidrolítica obtida para esta lipase foi de $936,0 \text{ U.g}^{-1}$ de gel, com carregamento de 80 mg.g^{-1} de gel, empregando glicidol como agente de ativação (Tabela 4.4). O derivado preparado em suporte ativado com epiclоридrina mostrou atividade hidrolítica máxima de $792,0 \text{ U.g}^{-1}$ de gel, empregando o mesmo carregamento. Para o suporte ativado com glutaraldeído, a atividade máxima do derivado imobilizado foi de apenas $240,0 \text{ U.g}^{-1}$ de gel. Esse valor de atividade foi inferior aos obtidos para derivados preparados me suportes ativados com glicidol e epiclоридrina

imobilizados com carregamento de 5 mg de proteína.g⁻¹ de gel. Nota-se que para carregamentos a partir de 30 mg.g⁻¹ de gel, os valores de atividade recuperada foram inferiores a 2%. Conforme anteriormente discutido, a alta reatividade de glutaraldeído explica esses resultados. Esse reagente não só provoca elevado entrecruzamento no suporte, reduzindo o diâmetro dos poros, como também reage excessivamente com os grupos reativos da enzima, causando distorção na proteína.

Nos ensaios conduzidos com carregamento a 10 mg.g⁻¹ de gel, quase toda a lipase oferecida foi imobilizada covalentemente, para os três tipos de agentes empregados. De todas as enzimas testadas, a máxima concentração de proteína imobilizada foi obtida por Lipex[®] 100L imobilizada em gel glioxil-amino-glutaraldeído, 54,1 mg.g⁻¹ de gel para o carregamento de 80 mg de proteína.g⁻¹ de gel. Para os derivados preparados em suportes ativado via glicidol e epiclorigrina, a concentração máxima de proteína imobilizada foi de 30,0 e 27,5 mg.g⁻¹ de gel. Contudo, os fatores de estabilização para essa proteína foram muito inferiores aos obtidos para LTL (Tabela 4.1). Conforme já discutido, a possível explicação é o elevado número de enlaces em um curto período de tempo ou a presença de resíduos lisina próximos ao sítio ativo ou em posições cuja ligação com o suporte gera configurações enzimáticas tensionadas que não resistam por longo tempo de incubação em altas temperaturas.

Tabela 4.4. Parâmetros de imobilização da Lipex[®] 100L em agarose ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.

CP (mg.g ⁻¹)	Glicidol			Epicloridrina			Glutaraldeído		
	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)
5	253,0	4,84	16,4	244,0	4,50	17,0	92,0	5,00	5,80
10	528,0	9,88	16,8	416,0	8,12	16,1	108,0	10,0	3,40
30	744,0	18,2	12,8	529,4	16,7	10,0	168,0	30,0	1,76
60	816,0	26,8	9,57	696,0	24,0	9,10	216,0	42,4	1,60
80	936,0	30,0	9,81	792,0	27,5	9,00	240,0	54,1	1,40

CP: Carregamento de proteína oferecida (mg de proteína.g⁻¹ de gel); AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%).

A Tabela 4.5 mostra que derivados de CALB tiveram valores de atividade hidrolítica imobilizada inferiores às outras enzimas, para condições similares de imobilização. Isso pode ser atribuído ao uso de azeite de oliva emulsificado como substrato, pois a enzima possui baixa especificidade por triacilgliceróis (Salis et al., 2003; Moreira et al., 2007). Contudo, visando apenas comparação dos protocolos de ativação e da influência da carga oferecida, foi adotado esse substrato. Os resultados da Tabela 4.5 mostram que a concentração de proteína imobilizada de CALB (proteína imobilizada/proteína oferecida – equação 3.6) foram muito inferiores as obtidas para as outras lipases, para cargas enzimáticas oferecidas iguais. Os derivados obtidos com ativação epóxi apresentaram carga de proteína imobilizada inferior a 6 mg.g⁻¹ de gel, mesmo quando eram oferecidos carregamentos iguais ou maiores que 30 mg.g⁻¹ de gel. A ativação com glutaraldeído conduziu à máxima carga de CALB imobilizada, 14,8 mg.g⁻¹ de gel, além de ter permitido 100% de imobilização para carregamentos inferiores a 10 mg. Esses resultados confirmam estudos anteriores realizados para a imobilização de CALB em gel de agarose ativado por diferentes protocolos (Rodrigues et al., 2008).

Tabela 4.5. Parâmetros de imobilização da CALB em agarose ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.

CP (mg.g ⁻¹)	Glicidol			Epícloridrina			Glutaraldeído		
	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)
5	66,0	1,23	67,4	62,0	1,06	73,5	35,3	5,00	8,86
10	84,0	2,40	44,0	90,5	2,80	40,6	47,8	10,0	6,00
30	108,0	5,12	26,5	108,0	4,12	32,9	57,4	14,8	4,87
60	126,0	5,86	27,0	120,0	4,35	34,6	65,4	14,4	5,71
80	144,0	5,80	31,1	156,0	5,40	36,2	69,6	14,7	5,94

CP: Carregamento de proteína oferecida (mg de proteína.g⁻¹ de gel); AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%).

A máxima atividade hidrolítica obtida para esta lipase foi de 156,0 U.g⁻¹ de gel, com carregamento de 80 mg.g⁻¹ de gel, empregando epícloridrina como agente de ativação (Tabela 4.5). O derivado preparado em gel ativado com glicidol apresentou atividade hidrolítica máxima de 144,0 U.g⁻¹ de gel, empregando o mesmo carregamento. Para o gel ativado com glutaraldeído, a atividade máxima do derivado imobilizado foi inferior a 70,0

U.g⁻¹ de gel. Dentre todos os derivados preparados, os de CALB imobilizados em glioxil-agarose foram os que apresentaram menor concentração de proteína imobilizada quando se ofereceu altos carregamentos, porém com elevada atividade recuperada.

Na presença de efeitos difusivos, a redução da atividade recuperada com o aumento da atividade enzimática desaparecida (quantidade de proteína ativa teoricamente imobilizada), é um comportamento esperado, pois há aumento da velocidade de reação por volume de catalisador. Além disso, uma maior quantidade de proteína imobilizada pode aumentar a limitação difusional pela redução do diâmetro do poro (Salis et al., 2003; Gomes et al., 2004; Rodrigues et al., 2008). A difusão do substrato nos poros do suporte é descrita pelo Módulo de Thiele (ϕ) e pela efetividade (η) - relação entre a atividade aparente do derivado e a atividade teoricamente imobilizada (Salis et al., 2003). O Módulo de Thiele é proporcional a velocidade de reação e inversamente proporcional a difusão e com o aumento do carregamento da enzima há um aumento da velocidade da reação e redução da difusividade do substrato nos poros do gel, aumentando o valor do Módulo de Thiele e reduzindo a efetividade (efetividade = atividade recuperada quando a redução na atividade aparente em relação à teórica ocorre somente por que há efeitos difusivos no sistema reacional). A atividade recuperada pode também ser inferior a 100% devido à distorção do sítio ativo da enzima pela imobilização e/ou efeitos de partição do substrato/produtos e efeitos do microambiente onde se encontra a enzima imobilizada: concentração de água, pH, interações hidrofóbicas, etc.

Para a LTL, verifica-se que o gel ativado com glicidol e epícloridrina fornece aproximadamente 100% de atividade recuperada no derivado imobilizado para 5 mg proteína imobilizada.g⁻¹ de gel (Tabela 4.2). Esse resultado indica que até atividade hidrolítica da ordem de 300 U.g⁻¹ de gel, não há efeitos difusivos na hidrólise de azeite de oliva. Indica também que não ocorreu distorção da enzima e nem efeitos de microambiente do suporte na atividade catalítica da enzima imobilizada. Portanto, a queda na atividade recuperada verificada com o aumento na quantidade de proteína imobilizada pode ser totalmente atribuída a efeitos difusivos e, nesse caso, atividade recuperada = efetividade. Desta forma, para os suportes ativados com glioxil, apenas quando a atividade hidrolítica de azeite de oliva for superior a 300 U.g⁻¹ de gel é esperado queda na efetividade. Na ativação do suporte com glutaraldeído, no entanto, ocorre expressiva queda na atividade recuperada, mesmo para baixos valores de atividade hidrolítica por grama de gel, sem grande variação com o aumento

da quantidade de proteína imobilizada. Isso indica que os baixos valores de atividade recuperada em suportes ativados com glutaraldeído são devidos principalmente às distorções.

Para as demais lipases, podem ter ocorrido distorções mesmo para os suportes glioxil, pois não foram alcançados 100% de recuperação de atividade mesmo para baixas quantidades de proteína imobilizada e, conseqüentemente, baixas velocidade de reação por volume de gel. Na ativação glutaraldeído, a atividade recuperada foi sempre mais baixa, devido à alta reatividade desse reagente, ocasionando mais distorção na enzima e a formação de uma estrutura mais fechada no gel, o que por sua vez diminui a velocidade de difusão do substrato.

4.1.2.3. Agarose 6BCL: Influência do Protocolo de Ativação na Conversão em Butirato de Butila Catalisada por LTL e LPF

Outra característica importante de um derivado de lipase que se pretende utilizar na síntese de biodiesel é o seu comportamento em meio aquo-restrito. Os resultados mostrados até agora indicam que os derivados com maior atividade hidrolítica e mais termoestáveis foram os obtidos na imobilização de LTL em agarose 6BCL. Esses derivados foram então empregados em reações em meio orgânico na síntese do éster aromatizante butirato de butila. A reação foi conduzida em meio de heptano por 24 h e os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 4.6. Visando uma comparação, foram também testados os derivados de LPF preparados por imobilização em agarose, que apresentaram os menores valores de atividade hidrolítica e fatores de estabilização.

Tabela 4.6. Síntese de butirato de butila catalisada por LTL e LPF imobilizadas em agarose 6 BCL ativada por diferentes protocolos.

Lipases	Agente de Ativação	Butirato de Butila (mM)^{24 h}
LTL	GLI	86,7
	EPI	85,5
	GLU	57,3
LPF	GLI	88,8
	EPI	85,5
	GLU	60,2

Os derivados preparados em suportes ativados por glioxil (glicidol e epícloridrina) foram mais ativos em meio orgânico que os derivados preparados em suportes ativados com glutaraldeído, apresentando comportamento similar aos resultados obtidos na reação de hidrólise de azeite de oliva. Estes derivados converteram acima de 85% os materiais de partida empregados (butanol e ácido butírico) em produto, enquanto os derivados de glutaraldeído converteram cerca de 60%. Os derivados de LPF mostraram os menores valores de atividade hidrolítica, entretanto, em síntese orgânica apresentaram um desempenho similar à LTL. Estes resultados indicam que ao menos algumas das substâncias protetoras presentes na solução de LPF possam ter sido imobilizadas também dificultando o acesso de substratos de alta massa molecular, como azeite de oliva, e em reações na presença de substratos de cadeia curta o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima foi favorecido. A análise de efeitos difusivos realizada anteriormente mostrou que para a LPF deve estar ocorrendo efeitos difusivos mesmo para baixa carga imobilizada. De todo modo, os derivados glioxil de LTL, os mais estáveis, mostraram bom desempenho em meio orgânico e seguem sendo os melhores derivados de agarose preparados.

Os derivados preparados por ativação glioxil (glicidol e epícloridrina) foram mais ativos em meio orgânico que os derivados preparados em suportes ativados com glutaraldeído, apresentando comportamento similar aos resultados obtidos na reação de hidrólise de azeite de oliva. Estes derivados converteram acima de 85% os materiais de partida empregados (butanol e ácido butírico) em produto, enquanto os derivados de glutaraldeído converteram cerca de 60%. Os derivados de LPF mostraram os menores valores de atividade hidrolítica, entretanto, em síntese orgânica apresentaram um desempenho similar à LTL. Estes resultados indicam que ao menos algumas das substâncias protetoras presentes na solução de LPF possam ter sido imobilizadas também dificultando o acesso de substratos de alta massa molecular, como azeite de oliva, e em reações na presença de substratos de cadeia curta o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima foi favorecido. A análise de efeitos difusivos realizada anteriormente mostrou que para a LPF deve estar ocorrendo efeitos difusivos mesmo para baixa carga imobilizada. De todo modo, os derivados glioxil de LTL, os mais estáveis, mostraram bom desempenho em meio orgânico e seguem sendo os melhores derivados de agarose preparados.

4.1.3. Suportes Agarose 10BCL e Sepabeads: Influência da Aminoação Química sobre as Propriedades Catalíticas de Lipases Microbianas Imobilizadas

Os suportes glioxil-agarose 10 BCL e glioxil-sepabeads têm sido amplamente empregados na imobilização de várias enzimas de interesse industrial. Eles vêm sendo estudados no grupo de pesquisa liderado pelo Dr. José Manuel Guisan do Instituto de Catálisis y Petroleoquímica da Universidad Autónoma de Madrid-Espanha (ICP-CSIC), razão pela qual esta etapa do trabalho foi desenvolvida no referido instituto em parceria com o Grupo de Tecnologia Enzimática liderado pela Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano (DEQ-UFSCar). Nesse estudo foram empregadas duas preparações de lipases oriundas de fonte microbiana de *Bacillus thermocatenuatus* (BTL2) não disponível comercialmente e obtida por fermentação em escala laboratorial e a lipase de *Candida antarctica* (CALB) comercializada pela Novozymes.

As duas preparações enzimáticas foram imobilizadas nos suportes anteriormente mencionados com a finalidade de obter derivados altamente termoestáveis. Uma vez que o maior número de grupos amino na superfície da enzima, mais alto fator de estabilização é esperado, foi realizada a aminoação química das lipases em fase sólida e analisados os efeitos desta modificação química sobre as propriedades catalíticas dos derivados. A atividade enzimática das lipases foi determinada para a hidrólise do éster *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) em pH 7,0, conforme metodologia descrita no item 3. 2.2.1.

Ambas as lipases foram imobilizadas por ligação covalente multipontual em géis glioxil. CALB foi imobilizada em géis glioxil-sepabeads e agarose e BTL2 somente em glioxil-agarose oferecendo-se um carregamento de 1 mg de proteína.g⁻¹ de gel. A aminoação química foi realizada empregando as duas preparações de lipases adsorvidas em octil-agarose, com posterior dessorção em tampão bicarbonato pH 10,05 50 mM na presença de Triton X-100 (1%) para a imobilização covalente das lipases. O enriquecimento de grupos amino na superfície da enzima foi realizada por modificação química de grupos carboxílicos presentes na região oposta ao sítio ativo (região altamente hidrofílica), via etilenodiamina (EDA) (López-Gallego et al., 2005; Fernandez-Lorente et al., 2008). A metodologia empregada foi descrita no item 3.2.8.4.

A imobilização de lipases aminadas em géis glioxil foi mais rápida se comparada com a enzima não modificada quimicamente, como ilustrado nas Figuras 4.4 (CALB) e 4.5 (BTL2).

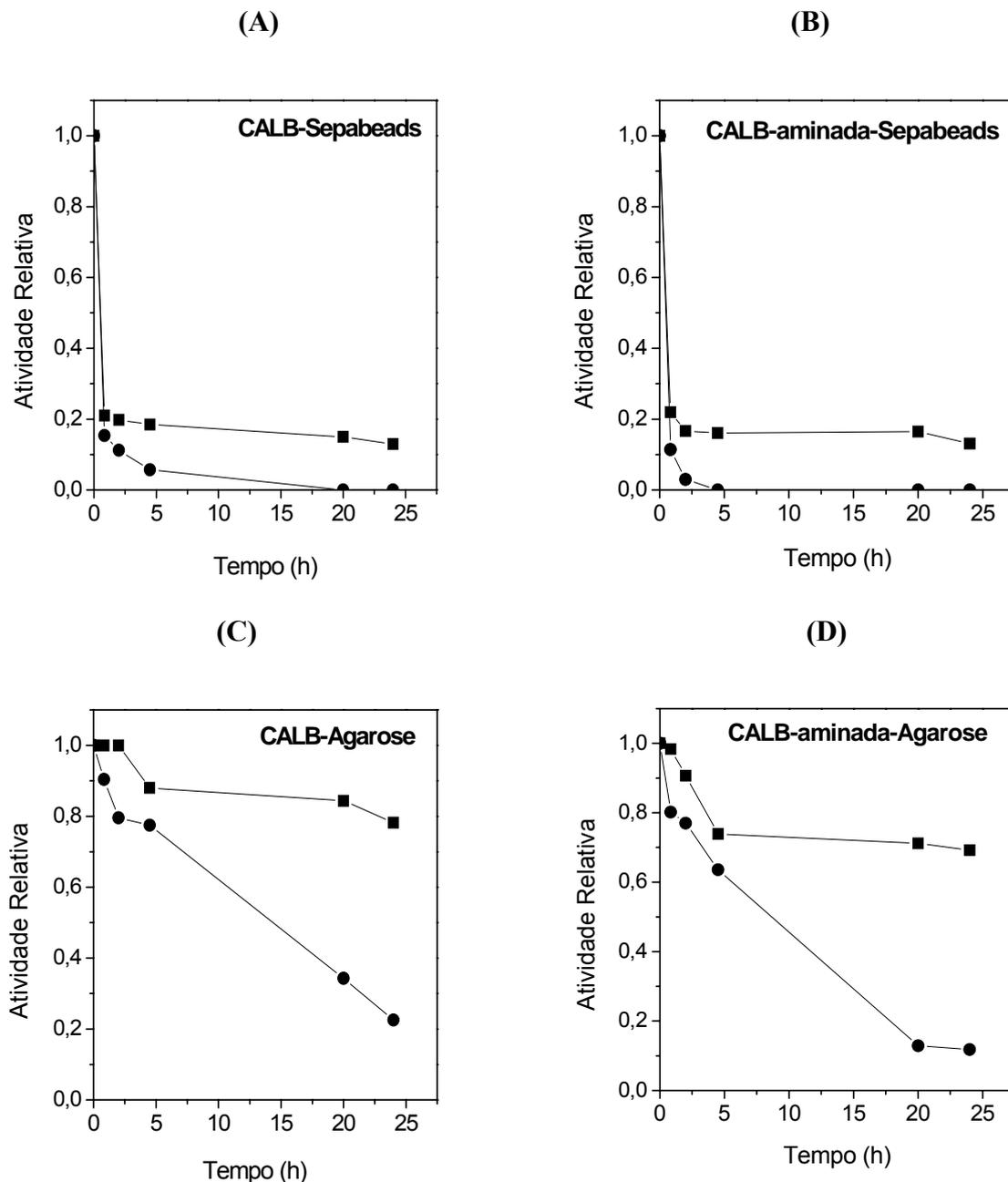


Figura 4.4. Desaparecimento de atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de lipase CALB em gel glioxil sepabeads sem aaminação química (A) e aminada quimicamente (B) e em gel glioxil agarose sem aaminação química (C) e aminada quimicamente (D) na presença de 1% de Triton X-100. A imobilização foi realizada por 24 h em tampão bicarbonato 50 mM pH 10,05 a 25 °C. Atividade da suspensão (■) e do sobrenadante (●).

Os novos grupos amino inseridos na estrutura superficial da enzima foram mais reativos que os grupos lisina pré-existentes e, por isso, maior velocidade de imobilização. Após 4 h de contato enzima-suporte, CALB aminada foi totalmente imobilizada em glioxil-sepabeads (Fig. 4.4A) e a lipase não-aminada só foi totalmente imobilizada após 20 h de incubação (Figura 4.4B).

Durante a imobilização de CALB em gel glioxil-sepabeads, verifica-se significativa perda da atividade hidrolítica na suspensão da ordem de 87%. Este comportamento pode ser atribuído à inativação da enzima imobilizada por distorção em contato com o suporte (distorção do sítio ativo) ou por efeitos difusivos. A imobilização de CALB em glioxil-agarose também foi realizada e a cinética de imobilização das enzimas aminada e não aminada é mostrada nas Figuras 4.4C e 4.4D. A velocidade de imobilização da lipase em glioxil-agarose foi inferior ao gel glioxil-sepabeads, não sendo alcançada total imobilização. Cerca de 90% da atividade oferecida foi imobilizada empregando CALB aminada, ligeiramente superior à lipase não modificada. Durante a imobilização em gel glioxil-agarose apenas 22 e 31% da atividade inicial foi inativada, quantificada pela atividade enzimática na suspensão (suporte + enzima), mostrando que durante a imobilização desta lipase em gel glioxil-agarose o efeito de distorção da enzima é menor que a imobilização em glioxil-sepabeads. Outro fato relevante é que a inativação da lipase durante a imobilização em glioxil-agarose nas formas aminada e não-aminada foi similar, mostrando que a modificação química não alterou significativamente a atividade catalítica da enzima.

Lipase BTL2 foi imobilizada multipontualmente em gel glioxil-agarose e a cinética de imobilização é mostrada na Figura 4.5. A lipase não-modificada e modificada quimicamente também apresentou redução da atividade durante a imobilização de 70 e 78%, respectivamente. Verifica-se que a perda de atividade hidrolítica durante a imobilização para a lipase não-aminada foi constatada até 4 h e após este período, ao final de 24 h, a atividade da suspensão permaneceu constante. Entretanto, na imobilização da lipase aminada, em 4 h toda a lipase havia sido imobilizada, mas as multi-interações entre enzima-suporte resultaram na perda de atividade na suspensão devido ao processo de rigidificação da enzima.

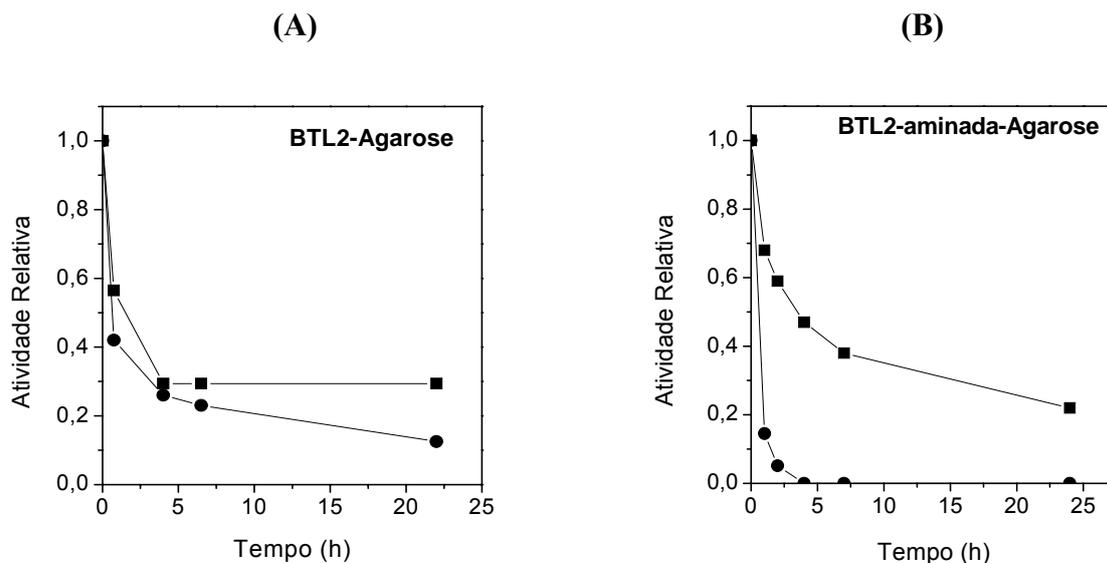


Figura 4.5. Desaparecimento de atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de lipase BTL2 em gel glioxil-agarose sem aaminação química (A) e aminada quimicamente (B) na presença de 1% de Triton X-100. A imobilização foi realizada por 24 h em tampão bicarbonato 50 mM pH 10,05 a 25 °C. Atividade da suspensão (■) e do sobrenadante (●).

Na Tabela 4.7 estão sumarizados os parâmetros de imobilização (rendimento de imobilização e atividade recuperada) das lipases CALB e BTL2 imobilizadas multipontualmente em géis glioxil-agarose e glioxil-sepabeads. A natureza do suporte e o protocolo de modificação química influenciaram significativamente sobre os parâmetros de imobilização das duas lipases.

CALB imobilizada em glioxil-sepabeads apresentou rendimento de imobilização de 100% nas duas formas (aminada e não-aminada) e os derivados preparados apresentaram valores similares de atividade recuperada, da ordem de 13-15%. Este baixo valor de atividade recuperada é decorrente das interações entre a enzima e o suporte durante o procedimento de imobilização que podem ter distorcido a enzima. Observa-se também que o processo de aaminação química não alterou as propriedades catalíticas de CALB imobilizada neste suporte.

Na imobilização de CALB imobilizada em glioxil-agarose não foi alcançado 100% de rendimento de imobilização. A lipase na forma aminada apresentou rendimento de imobilização de 88%, 11% a mais que a lipase não-aminada. Os valores de atividade recuperada também foram bastante similares, da ordem de 56 e 61% nas formas não-aminada

e aminada, respectivamente. Esses valores mostram que a aaminação química de lipase CALB influenciou somente no rendimento de imobilização. Maior número de grupos reativos (amino) foi inserido na enzima, facilitando o processo de imobilização. A principal razão na obtenção de derivados de CALB mais ativos foi a utilização do suporte glioxil-agarose como matriz de imobilização. A estrutura interna da resina acrílica sepabeads permite maior rendimento de imobilização, no entanto, a agarose permitiu obter derivados com maior atividade recuperada, como mostrado na Tabela 4.7. Lipase BTL2 aminada foi totalmente imobilizada ao final de 24 h, o que não foi verificado para a lipase sem modificação, que apresentou 87% de rendimento de imobilização. A aaminação da enzima forneceu derivado com maior atividade recuperada (22%), se comparada com a lipase não modificada quimicamente (17%).

Tabela 4.7. Parâmetros de imobilização de CALB e BTL2 imobilizadas em glioxil-agarose e glioxil-sepabeads.

Derivados	Rendimento de imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)
CALB-sepabeads	100	15
CALB-agarose	77	56
CALB-sepabeads aminada	100	13
CALB-agarose aminada	88	61
BTL2-agarose	87	17
BTL2-agarose aminada	100	22

Os diferentes valores de atividade recuperada encontrados para as duas preparações de lipases são função da estrutura química de cada enzima. Como foi mencionado anteriormente, lipase CALB possui em sua estrutura química apenas nove resíduos lisina (Rodrigues et al., 2008) e na estrutura da BTL2 há 12 resíduos (Fernandez-Lorente et al., 2008), mostrando que na imobilização de BTL2 há maior interação da enzima com o suporte e, conseqüentemente, maior distorção da estrutura ativa da enzima. No entanto, o maior número de enlaces entre a enzima e o suporte tende a estabilizar termicamente o biocatalisador preparado, como é mostrado a seguir.

4.1.3.1. Estabilidade Térmica de Derivados de BTL2 e CALB Imobilizadas em Glioxil-Agarose e Glioxil-Sepabeads: Efeito da Aminoação Química Sobre a Estabilização Térmica dos Derivados

Lipases CALB e BTL2 foram imobilizadas em glioxil-suportes nas formas não modificada e modificada quimicamente, no intuito de aumentar o número de enlaces da enzima com o suporte. A inativação das lipases foi conduzida a 70 °C e as cinéticas de inativação são mostradas na Figura 4.6. Os ensaios de inativação térmica foram realizados de acordo com metodologia descrita no item 3.2.4. Lipase CALB foi imobilizada em géis glioxil-agarose e sepabeads e a lipase BTL2 foi imobilizada somente em glioxil-agarose. Um modelo de decaimento não-linear de primeira ordem foi ajustado aos dados experimentais visando-se determinar os tempos de meia-vida da enzima solúvel e dos biocatalisadores preparados e, assim, determinar o fator de estabilidade em relação à enzima solúvel (Sadana e Henley, 1987).

De acordo com a cinética de inativação, em ambos os casos, a imobilização das lipases modificadas quimicamente melhorou a estabilidade térmica dos derivados, se comparado com as lipases não-aminadas. Esta melhora na estabilidade térmica dos derivados foi decorrente do maior número de ligações covalentes envolvendo os grupos amino dos resíduos lisina e os novos grupos amino inseridos após a aminoação. O tempo de meia-vida estimado para as lipases CALB e BTL2 nas formas solúveis a 70 °C foi de aproximadamente 5 min.

Os derivados de CALB imobilizados em glioxil-sepabeads foram pouco estáveis termicamente, com valores respectivos de tempo de meia-vida de 0,38 e 0,71 h para a lipase não-modificada e modificada quimicamente. Em 2 h, foi observada total inativação tanto nas formas aminada e não-aminada. De acordo com os resultados obtidos, a imobilização de CALB em glioxil-sepabeads causa distorções da estrutura ativa da enzima devido à má congruência geométrica do suporte, ou seja, a enzima sofre distorção para formar enlaces com os grupos glioxil do suporte. Por este motivo, a lipase BTL2 não foi imobilizada neste suporte.

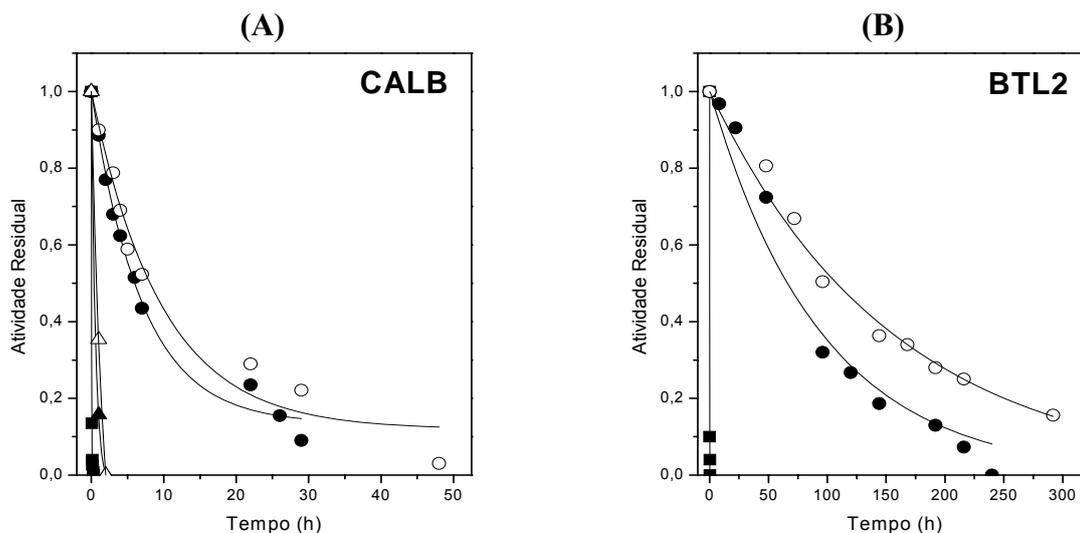


Figura 4.6. Estabilidade térmica de CALB (A) e BTL2 (B) solúveis (■) e immobilizadas em glioxil-sepabeads na forma aminada (Δ) e não aminada (\blacktriangle) e em glioxil-agarose na forma aminada (\circ) e não aminada (\bullet).

A utilização de géis glioxil-agarose na imobilização de lipases microbianas forneceu derivados mais estáveis termicamente. Em relação à lipase solúvel, a lipase BTL2 aminada em glioxil-agarose estabilizou 4360 vezes e a lipase BTL2 não aminada estabilizou 2648 vezes em relação à enzima solúvel, com valores de tempo de meia-vida de 65 e 108 h, respectivamente. Para a CALB aminada e não-aminação immobilizadas em glioxil-agarose, a estabilização térmica da enzima foi 287 e 211 vezes em relação à enzima solúvel e os tempos de meia-vida estimados foram de 8,13 e 5,89 h, respectivamente. Em suma, a estratégia de aminação química das lipases foi importante para a obtenção de derivados mais estáveis termicamente. Resultados semelhantes, em termos de aumento da estabilidade térmica de enzimas após aminação química, são relatados na literatura (Lopez-Gallego et al., 2005). Glutaril acilase (GA) e Penicilina G acilase (PGA) foram aminadas quimicamente e immobilizadas em gel glioxil-agarose. GA aminada, a estabilização térmica foi melhorada em um fator de quatro vezes, se comparada com a enzima immobilizada não-aminação e para a PGA, este fator foi de 20 vezes.

Neste trabalho, lipase CALB foi inicialmente imobilizada em glioxil-agarose 6 BCL ativado com glicidol e o fator de estabilização estimado foi de 23,0 (Tabela 4.1). A imobilização dessa mesma enzima sem modificação química em glioxil-agarose 10 BCL elevou o fator de estabilidade para 211,0 vezes. Esta drástica diferença entre os fatores de

estabilização decorre da concentração de agarose que constitui os suportes. Gel de agarose 6 BCL é sintetizado a partir de uma solução de agarose 6%, com diâmetro de poros interno superior ao gel de agarose 10 BCL (matriz mais compacta). O aumento da concentração de agarose permite aumento também do grau de ativação do suporte e, conseqüentemente, do número de enlaces possíveis entre a enzima e o suporte, aumentando o grau de rigidificação da enzima e conseqüentemente a sua estabilidade térmica.

4.1.3.2. Estabilidade de Derivados de BTL2 e CALB Imobilizadas em Glioxil-Agarose Incubados em Solventes Orgânicos: Efeito da Aminoação Química e do Tipo de Solvente Sobre a Atividade Catalítica dos Derivados

Derivados de CALB e BTL2 imobilizadas em glioxil-agarose 10 BCL foram incubados em pH 7,0 a 37 °C na presença de solventes orgânicos dioxano e etanol a 75% (v/v). Estes dois solventes são bastante empregados em síntese orgânica e por isso foi avaliada a influência dos solventes sobre a atividade das lipases, conforme mostrado nas Figuras 4.7A e B.

Derivados de CALB foram mais estáveis que os de BTL2 quando incubados em solventes orgânicos. O processo de aminoação da enzima também permitiu obter derivados mais estáveis na presença de solventes. Dentre os dois solventes avaliados, os derivados preparados foram mais estáveis em etanol. Após 188 h de incubação na presença de dioxano a 37 °C, a atividade dos derivados de CALB aminada e não-aminada apresentou uma redução da atividade catalítica de 23 e 47%, respectivamente, e quando incubados em etanol, a atividade permaneceu inalterada. BTL2 não-aminada na presença de dioxano foi totalmente inativada após 180 h de incubação, enquanto o derivado de BTL2 aminado reteve 22% da atividade inicial. BTL2 aminada na presença de etanol não sofreu perda de atividade. Dentre os biocatalisadores testados e incubados na presença de etanol, somente BTL2 sem modificação química apresentou redução da atividade catalítica, da ordem de 38%.

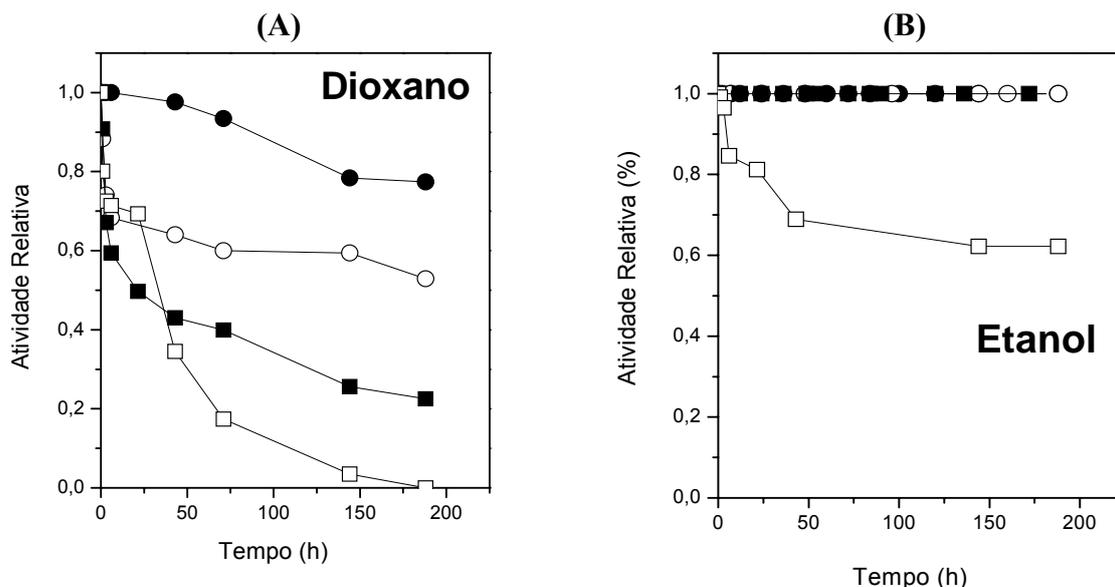


Figura 4.7. Estabilidade em dioxano (A) e etanol (B) dos derivados de CALB aminada (●) e não-aminada (○) e de BTL2 aminada (■) e não-aminada (□) imobilizada em glioxil-agarose.

Os derivados na presença de etanol foram mais estáveis em relação ao dioxano. Estes resultados são interessantes no que se refere à sua utilização em reações de síntese orgânica na presença desse solvente, como por ex., nas reações de síntese de biodiesel por etanólise de óleos vegetais, alvo de interesse do presente trabalho. A aminação das outras preparações de lipases tais como LTL, LPF e Lipex[®] 100L também foi realizada, de acordo com o protocolo de aminação adotado. Entretanto, as lipases foram inativadas durante a aminação química devido à baixa estabilidade nas condições de ensaio (pH 4,75), inviabilizando a aminação dessas enzimas.

4.1.4. Imobilização de Lipase LTL em Complexos Polieletrólíticos (CPE) de Quitosana Hidrofobizados por TNBS e Laurinaldeído

4.1.4.1. Efeito do Tipo de Complexo Polieletrólítico, da Modificação Química com TNBS e do Agente de Ativação Sobre os Parâmetros de Imobilização.

Os complexos polieletrólitos são formados com o objetivo de obter hidrogéis mais versáteis, com diferentes estruturas química e física, o que pode melhorar sua atuação em uma determinada aplicação, como a originalmente testada com sucesso para liberação

controlada de fármacos (Berger et al., 2004).

Desta forma, no Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, foram também estabelecidos protocolos de obtenção de complexos polieletrólíticos empregando diferentes tipos de biopolímeros como alginato de sódio, carragenina e gelatina visando melhorar a estrutura interna dos hidrogéis de quitosana para utilização como suporte de imobilização de enzimas de interesse industrial como quimotripsina, carboxipeptidase A (CPA) e celulases (Adriano, 2008; Adriano et al., 2008). A utilização destes complexos polieletrólíticos como matriz de imobilização de enzimas aumentou significativamente a estabilização térmica dos derivados imobilizados e por esta razão foram empregados, neste trabalho, especificamente para imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL).

LTL foi imobilizada em complexos polieletrólíticos (CPE) de quitosana ativadas por diferentes protocolos e avaliada a influência do tipo de matriz sobre os parâmetros de imobilização tais como proteína imobilizada, atividade hidrolítica, atividade recuperada e fator de estabilização. Hidrogel de quitosana foi empregado como controle. As concentrações de quitosana e de outros biopolímeros (alginato, PVA, gelatina e κ -carragenina) foram estabelecidas por Adriano et al. (2008) na imobilização de quimotripsina em complexos polieletrólíticos ativados por diferentes protocolos. O efeito da modificação química dos CPE com TNBS teve como objetivo aumentar a hidrofobicidade destes suportes, estimada pela adsorção de corante hidrofóbico Rosa de Bengala e porcentagem de adsorção de água. Este composto bloqueia os grupos amino da quitosana, reduzindo o caráter hidrofílico das matrizes e, conseqüentemente, aumentando a hidrofobicidade dos suportes. O uso de TNBS na hidrofobização de suportes para a imobilização de enzimas não é relatado na literatura. A presença do anel aromático em sua estrutura pode alterar o microambiente do suporte, favorecendo a partição dos substratos de lipases (triacilgliceróis) para os interstícios da matriz, e aumentando, assim, a eficiência catalítica de derivados de lipases. Os ensaios foram conduzidos de acordo com metodologia descrita no item 3.2.8.6.

A influência dos CPE testados e a modificação química com TNBS sobre os parâmetros de imobilização da lipase LTL imobilizada em hidrogéis híbridos de quitosana são mostradas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Influência do tipo de CPE e da modificação química com TNBS sobre os parâmetros de imobilização da lipase LTL imobilizada em hidrogéis híbridos de quitosana. Carregamento oferecido de 5 mg proteína.g⁻¹ de gel (956 U. g⁻¹ de gel).

Suporte	TNBS	Agente de Ativação	AH_{der} (U.g⁻¹ de gel)	PI (mg.g⁻¹ de gel)	AR (%)	t_{1/2} (h)	FE
Quitosana	Ausência	GLI	109,1	1,42	40,0	1,34	15,2
		EPI	97,6	1,20	42,5	1,10	12,5
		GLU	95,3	2,99	13,1	0,59	7,10
	Presença	GLI	108,9	0,87	65,5	1,22	13,9
		EPI	97,6	0,98	47,1	1,56	17,7
		GLU	90,8	1,98	16,0	0,77	8,75
Quitosana-Gelatina	Ausência	GLI	99,9	1,08	48,5	1,00	12,5
		EPI	99,9	1,31	40,0	0,90	11,2
		GLU	95,3	3,05	16,3	0,72	8,62
	Presença	GLI	118,1	1,18	52,4	2,07	23,5
		EPI	121,6	1,16	74,2	2,19	27,3
		GLU	113,6	3,20	16,4	0,92	11,0
Quitosana-κ-carragenina	Ausência	GLI	74,0	0,95	25,1	0,66	7,45
		EPI	50,0	1,08	16,1	0,46	5,24
		GLU	36,3	1,98	5,80	0,20	2,31
	Presença	GLI	104,4	1,06	38,7	0,83	9,44
		EPI	140,7	1,22	50,2	1,45	16,5
		GLU	95,7	1,87	14,3	0,93	10,6
Quitosana-PVA	Ausência	GLI	131,5	1,44	44,6	1,24	14,3
		EPI	115,1	1,55	38,9	1,27	14,6
		GLU	104,1	2,88	15,3	1,07	12,3
	Presença	GLI	160,5	1,36	51,3	2,61	30,1
		EPI	178,7	1,39	54,9	2,72	31,4
		GLU	148,9	2,72	23,1	1,92	22,1
Quitosana-Alginato	Ausência	GLI	163,5	1,82	51,4	0,70	7,89
		EPI	201,7	1,70	58,9	1,07	12,3
		GLU	194,9	2,97	28,3	0,82	9,29
	Presença	GLI	234,6	1,24	67,8	3,93	45,3
		EPI	217,0	1,11	61,7	3,99	45,2
		GLU	213,7	3,54	31,7	3,89	44,2

AH_{der}: atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Proteína imobilizada (mg.g⁻¹ de suporte); AR: Atividade recuperada (%); t_{1/2}: tempo de meia-vida (h) e FE: Fator de estabilidade.

A adição de alginato à quitosana melhorou a estrutura interna do hidrogel em relação ao hidrogel de quitosana controle. Similar concentração de proteína foi imobilizada nesses dois suportes, porém, a atividade hidrolítica do complexo polieletrólítico foi

aproximadamente duas vezes superior ao hidrogel controle.

A modificação química da quitosana pura com TNBS não melhorou significativamente os parâmetros de imobilização, inclusive o fator de estabilidade. É provável que a modificação química com TNBS tenha melhorado o microambiente interno do suporte para a imobilização da enzima, conforme esperado, mas a pobre congruência geométrica entre o gel de quitosana pura e a enzima não permitiu melhoria dos parâmetros de imobilização.

Entretanto, os resultados mostram que quando matrizes híbridas de quitosana eram hidrofobizadas com TNBS foi possível verificar a formação de um microambiente favorável ao processo de imobilização da lipase microbiana sendo constatado um aumento da atividade de hidrólise e aumento na estabilização térmica da enzima. Pode-se dizer que a utilização de polieletrólitos melhorou a congruência geométrica do suporte e proporcionou a formação de um microambiente favorável à imobilização e estabilização de enzimas.

Dos agentes de ativação testados, glutaraldeído foi o composto que forneceu a maior porcentagem de proteína imobilizada devido à sua elevada reatividade em pH alcalino. Tal reatividade também implica formação de um microambiente com diâmetro de poros menor do que a superfície interna obtida para os hidrogéis ativados por epóxidos (glicidol e epícloridrina), conforme constatado anteriormente para a lipase LTL imobilizada em gel glioxil-amino-glutaraldeído-agarose (Tabela 4.1). A formação de ligações entre os grupos ativos do suporte ativado com esse agente e outros grupos ativos da enzima, não somente grupos amino, mas também hidroxilas, sulfetos e outros, causam distorção na estrutura da enzima. Elevada concentração de proteína foi imobilizada em hidrogéis ativados com glutaraldeído, porém a atividade hidrolítica dos derivados foi inferior aos derivados obtidos com ativação epóxi, comportamento similar às lipases imobilizadas em gel de agarose. Dentre os quatro biopolímeros testados (gelatina, PVA, carragenina e alginato), os biocatalisadores que apresentaram melhores parâmetros de imobilização foram obtidos para a lipase imobilizada em complexo polieletrólítico quitosana-alginato hidrofobizado com TNBS. Para o carregamento de 5 mg de proteína.g⁻¹ de gel, os três agentes de ativação produziram atividade hidrolítica superior a 200 U.g⁻¹ de gel, porém o derivado obtido com ativação glicidol apresentou atividade hidrolítica ligeiramente superior aos demais agentes (234 U.g⁻¹ de gel). Valores similares de fator de estabilidade foram obtidos para os três agentes de ativação, da ordem de 45 vezes mais estáveis que a enzima solúvel.

A modificação química de quitosana aumentou a concentração de proteína imobilizada em 16% quando ativada com glutaraldeído, enquanto na quitosana controle verificou-se uma redução de 33% na imobilização da proteína. Provavelmente, o agente de hidrofobização TNBS gerou um menor número de grupos ativos para a imobilização da enzima em quitosana controle se comparado com o gel híbrido e o decréscimo de grupos amino disponíveis após a reação com TNBS foi maior para o hidrogel de quitosana controle. Glutaraldeído reage preferencialmente com os grupos amino do suporte, mas também pode sofrer ataque nucleofílico de outros grupos reativos presentes no suporte como grupos hidroxilas. De acordo com a literatura, hidrogéis de alginato de sódio foram reticulados com glutaraldeído na encapsulação de pesticidas para a liberação controlada em solos (Kulkarni et al., 2000). De acordo com a análise de infravermelho, os autores observaram que os grupos hidroxilas do suporte desapareceram e ligações éter foram formadas após a reação dos grupos hidroxila do suporte com os grupos aldeído do glutaraldeído. Provavelmente, esse agente reage preferencialmente com os grupos hidroxila do alginato do que com os grupos hidroxila da quitosana e dos outros biopolímeros testados. Para os hidrogéis híbridos de PVA, gelatina e κ -carragenina ativados com glutaraldeído, não foi observada influência significativa da modificação química sobre a imobilização de proteína.

O complexo polieletrólítico quitosana-alginato sem modificação química ativado por agentes epóxidos (glicidol e epícloridrina) apresentou maior porcentagem de proteína imobilizada se comparado com a matriz modificada quimicamente com TNBS. Os resultados evidenciam que a reação do TNBS com esta matriz reduz o número de grupos reativos no suporte. Possivelmente, os grupos glioxil dessa matriz também reagem com o TNBS. Para o hidrogel de quitosana controle e os polieletrólitos quitosana-gelatina, κ -carragenina e PVA também não foi observada influência significativa da modificação química na quantidade de proteína imobilizada.

Na Figura 4.8 são mostradas as curvas de desaparecimento da atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões preparadas, bem como a atividade do controle (enzima solúvel). A atividade enzimática desaparecida também foi fortemente influenciada pelo tipo de agente de ativação empregado, comportamento semelhante da mesma enzima imobilizada em agarose.

A imobilização de LTL em gel quitosana-alginato-TNBS ativado com glutaraldeído foi finalizada após 7 h de incubação em pH alcalino, imobilizando cerca de 70%

da atividade enzimática oferecida inicialmente, que corresponde aproximadamente a 3,5 mg de proteína.g⁻¹ de gel. A imobilização desta lipase na matriz ativada por glutaraldeído é mais rápida devido à elevada reatividade deste agente em pH alcalino. A imobilização da enzima em glioxil-quitosana-alginato-TNBS também foi mais lenta em consequência da baixa concentração de resíduos lisina presentes em LTL (apenas sete resíduos). Em termos de concentração de proteína imobilizada, os derivados preparados com glioxil-quitosana-alginato-TNBS são similares aos obtidos em agarose (~1,2 mg de proteína.g⁻¹ de gel). Estes derivados só diferem drasticamente nos valores de atividade hidrolítica e atividade recuperada, mostrando que o suporte quitosana-alginato-TNBS possui menor diâmetro de poros em relação à agarose (Tabela 4.8).

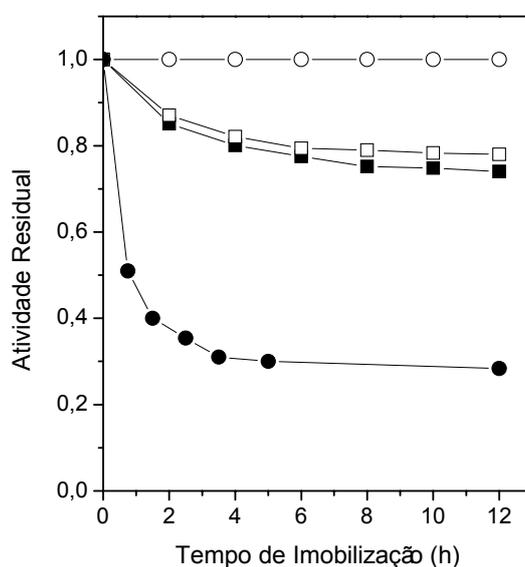


Figura 4.8. Desaparecimento de atividade hidrolítica dos sobrenadantes das suspensões de imobilização de lipase LTL imobilizada em gel quitosana-alginato-TNBS ativado por glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●) em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,05 na presença de 0,15% de Triton X-100 a 25 °C. Carga de proteína oferecida de 5 mg.g⁻¹ de gel e a atividade enzimática nas condições de imobilização do controle (○).

Quitosana-κ-carragenina foi o polieletrólito que resultou nos menores valores de atividade hidrolítica (Tabela 4.2). Este hidrogel possui alta hidroflicidade, alta retenção de água, e mesmo com a modificação química com TNBS a concentração de água na matriz foi superior aos outros hidrogéis testados. Similares resultados, quanto à hidroflicidade de

hidrogéis de κ -carragenina, são mostrados na literatura (Tapia et al., 2004). Esses autores testaram complexos polieletrólíticos de quitosana-alginato e quitosana- κ -carragenina na liberação controlada de princípios ativos e verificaram que o complexo quitosana-alginato possui propriedades físicas mais favoráveis à liberação controlada de fármacos que o complexo quitosana- κ -carragenina devido à alta hidrofiliabilidade deste complexo. Os autores relataram a formação de uma estrutura interna mais favorável à liberação de fármacos quando foi usado o complexo quitosana-alginato, corroborando os resultados experimentais obtidos no presente trabalho.

Os derivados de quitosana-alginato-TNBS ativados por diferentes protocolos obtiveram apresentaram maiores valores de fator de estabilização entre os derivados testados e a cinética de inativação dos derivados a 70 °C é mostrada na Figura 4.9. Os dados experimentais também foram ajustados a um modelo exponencial de decaimento não linear de primeira ordem para a estimativa dos tempos de meia-vida e do fator de estabilidade (Sadana e Henley, 1987).

Os valores do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para os três derivados obtidos foram próximos a 4 h e os valores de fator de estabilidade foram próximos a 45, ou seja, a lipase imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativada por diferentes protocolos foi 45 vezes mais estável que a enzima na forma solúvel. Quitosana-alginato sem modificação química foi 4-5 vezes menos estável que o suporte hidrofobizado. Pode-se afirmar que o processo de hidrofobização ocasionou a formação de um microambiente favorável para a estabilização da enzima, ou seja, a geometria interna do suporte favoreceu multi-interações entre a enzima e os grupos reativos do suporte que melhorou a estabilização térmica desses derivados (boa congruência geométrica desta matriz após o processo de modificação química). A segunda matriz híbrida com maior estabilização térmica da LTL foi quitosana-PVA ativada com glicidol e epícloridrina, com fatores de estabilização de 30,1 e 31,4, respectivamente. Com respeito à estabilização térmica, a influência do tipo de biopolímero empregado para a obtenção de matrizes híbridas foi na seguinte ordem: alginato > PVA > gelatina > quitosana controle > κ -carragenina. Hidrogéis quitosana controle e quitosana- κ -carragenina modificada com TNBS apresentaram valores de fator de estabilidade semelhantes a 70 °C.

Todos os hidrogéis híbridos apresentaram aumento na estabilização térmica da enzima com a modificação química do suporte com TNBS, principalmente o hidrogel quitosana-alginato, exceto para a quitosana controle e quitosana- κ -carragenina. O complexo

polieletrólítico quitosana-alginato é formado por interações iônicas entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxilatos do alginato. Essas interações são controladas pelo pH do meio, de acordo com relatos sumarizados no item 2.3.4.1. Após a modificação química, seguido da ativação com glicidol, epicloridrina e glutaraldeído, ocorre a reticulação entre os biopolímeros dos complexos polieletrólíticos que confere maior resistência mecânica e química às matrizes. Ocorrida a reticulação, o pH do meio não influencia mais na integridade do polieletrólito.

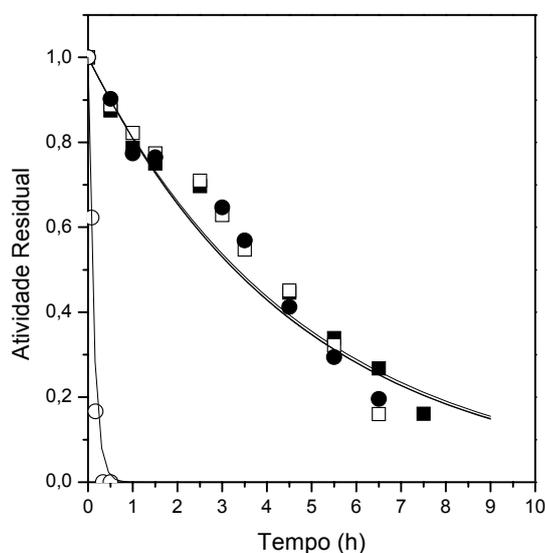


Figura 4.9. Estabilidade térmica da lipase LTL solúvel (○) e imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativado com glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●). A inativação térmica foi realizada a 70 °C em tampão fosfato 100 mM pH 8,0.

Os efeitos mais importantes da modificação química com TNBS foram os aumentos da atividade catalítica e da estabilização térmica da lipase LTL imobilizada, decorrente da formação de microambiente que favoreceu a interação da enzima com o suporte. Na estabilização de enzimas por imobilização, é necessário um alinhamento entre os grupos reativos do suporte com os grupos da enzima para que ocorram multi-interações e na hidrofobização das matrizes híbridas, ocorreu uma maior proximidade entre os biopolímeros que constituíam estas matrizes. Para as lipases, a hidrofobicidade da matriz é um parâmetro muito importante para que o acesso do substrato (óleo) aos interstícios da matriz seja favorecido. O efeito da modificação química com TNBS sobre a hidrofobicidade do suporte

selecionado quitosana-alginato pode ser estimada por adsorção de corante hidrofóbico Rosa de Bengala e a cinética de adsorção do corante é mostrada na Figura 4.10. Como controle foi empregado o polieletrólito não modificado quimicamente, conforme metodologia descrita no item 3.2.7.1.

Os resultados mostrados na Figura 4.10 indicam que após 15 min a matriz quitosana-alginato-TNBS adsorveu três vezes mais corante Rosa de Bengala que o suporte não modificado quimicamente. Após 60 min de incubação, o hidrogel não modificado adsorveu $771,0 \pm 9,8$ e o hidrogel modificado quimicamente adsorveu $973,3 \pm 21 \mu\text{g}$ de corante. g^{-1} de gel. Gupta e Jabrail (2006) avaliaram o efeito da reticulação de quitosana de diferentes graus de desacetilação e reticulados com diferentes concentrações de glutaraldeído sobre a hidrofobização do gel na adsorção de rosa de bengala. O gel obtido a partir de quitosana com grau de desacetilação de 62% e reticulado com glutaraldeído a 12% adsorveu 0,22 mL de corante por μm^2 de gel, bastante superior ao mesmo gel sem reticulação com glutaraldeído ($0,029 \text{ mL} \cdot \mu\text{m}^{-2}$), mostrando que os resultados apresentados no presente trabalho estão de acordo com os apresentados na literatura.

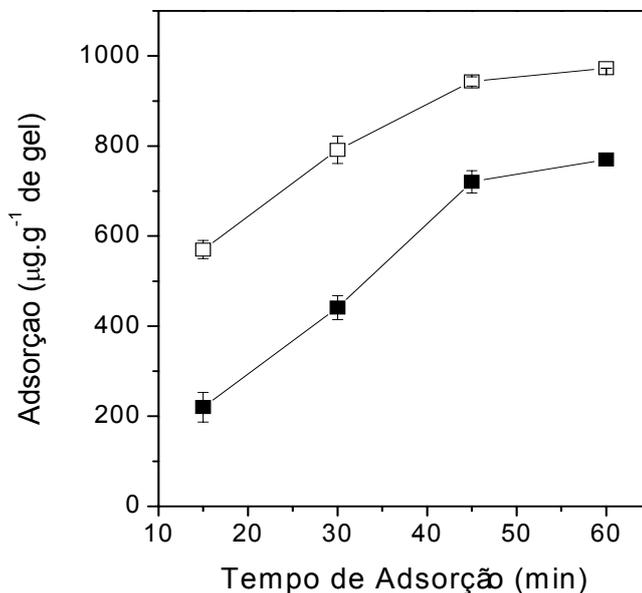


Figura 4.10. Cinética de adsorção do corante hidrofóbico Rosa de Bengala em hidrogéis híbridos de quitosana-alginato (■) e quitosana-alginato-TNBS (□).

A porcentagem de hidratação (PH) é outro parâmetro empregado para a estimativa da hidrofobicidade de um material. Como a hidrofobicidade e hidrofiliabilidade são características opostas, a determinação da porcentagem de hidratação de um hidrogel também pode ser usada para avaliar a hidrofobicidade de um suporte (Gupta e Jabrail, 2006). Quitosana é hidrofílica em meio ácido devido à presença de grupos aminos livres, no entanto, após a modificação química por reticulação dos grupos amino, o biomaterial apresenta caráter hidrofóbico, reduzindo a capacidade de retenção de água em sua molécula (Gonçalves et al., 2005). Por isso, a porcentagem de hidratação de quitosana-alginato não modificada e modificada quimicamente com TNBS, estimado conforme descrito no item 3.2.7.2, também foi avaliada por incubação das matrizes em solução aquosa pH 7,0 por 24 h e os resultados estão sumarizados na Tabela 4.9. O hidrogel modificado quimicamente reteve $68,8 \pm 5,0\%$ de água, duas vezes inferior ao comportamento verificado no hidrogel não modificado ($161,9 \pm 14,4\%$). Em pH 3,0 foi verificada total dissolução do polieletrólito não modificado quimicamente enquanto o suporte modificado quimicamente manteve sua total integridade (dados não mostrados). Resultados similares foram obtidos por Gupta e Jabrail (2006). Hidrogel de quitosana com grau de desacetilação de 62% e reticulado com glutaraldeído a 12% apresentou menor porcentagem de hidratação (150%) em comparação com quitosana não reticulada (320%).

Tabela 4.9. Adsorção de corante hidrofóbico Rosa de Bengala e porcentagem de hidratação (PH) de quitosana-alginato não modificado e modificado quimicamente com TNBS.

CPE	Adsorção de Rosa de Bengala ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de gel)	PH (%)
Quitosana-Alginato	$771,0 \pm 9,8$	$161,9 \pm 14,4$
Quitosana-Alginato-TNBS	$973,3 \pm 21$	$68,8 \pm 5,0$

Ainda visando melhor caracterização do efeito da modificação química com TNBS, foi também estimada a porcentagem de grupos amino que reagiram com TNBS (item 3.2.7.3), bem como o efeito da etapa de ativação do suporte com glicidol, epícloridrina e glutaraldeído pós-modificação química sobre este parâmetro. De acordo com a literatura, um dos agentes de ativação empregado no presente trabalho, glutaraldeído, é extensivamente empregado na reticulação de hidrogéis de quitosana (Berger et al., 2004; Gonçalves et al.,

2005; Gupta e Jabrail, 2006), o mesmo pode ser verificado para a epícloridrina (Gonçalves et al., 2005; de Oliveira et al., 2006). A aplicação de glicidol na reticulação de hidrogéis não é relatada. Os resultados de porcentagem de reticulação de grupos amino na modificação química com TNBS e na ativação pós-modificação química com glicidol, epícloridrina e glutaraldeído são mostrados na Figura 4.11.

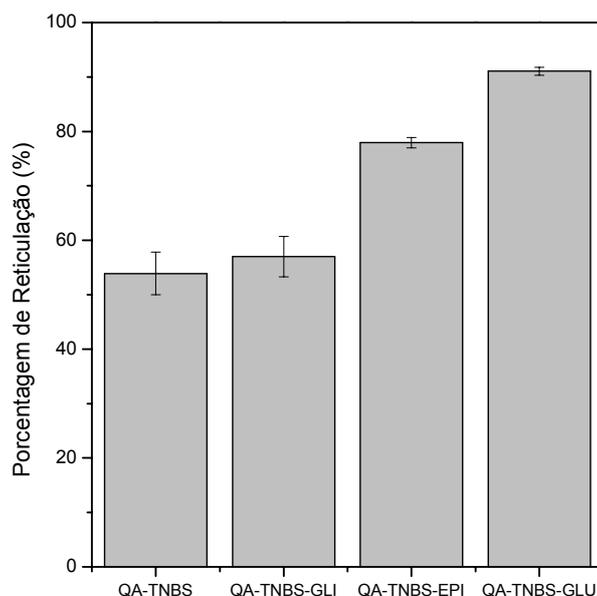


Figura 4.11. Porcentagem de reticulação de hidrogéis de quitosana-alginato-TNBS e ativados por diferentes protocolos.

A porcentagem de reticulação dos grupos amino presentes na quitosana com o processo de hidrofobização com TNBS foi de 54 %, estimado conforme descrito no item 3.2.7.3. Com a ativação com glicidol, não foi verificada alteração da concentração de grupos amino remanescentes, mostrando que o glicidol não sofre ataque nucleofílico dos grupos amino do suporte nas condições empregadas na etapa de ativação do suporte. A ativação com epícloridrina reduziu a concentração de grupos amino do suporte, com porcentagem de reticulação próxima a 80%. O protocolo de ativação adotado (Beppu et al., 2004) utiliza excesso do agente de ativação, em comparação à metodologia adotada para a ativação com glicidol (Guisán, 1988) o que auxiliou na reticulação do suporte. A ativação com glutaraldeído elevou a porcentagem de reticulação para valores superiores a 90%. Contudo,

mesmo ativando o suporte com excesso de glutaraldeído, ainda permanecem sem reagir 9% dos grupos aminos.

Esta elevada porcentagem de reticulação pelo glutaraldeído é decorrente da sua elevada reatividade e afinidade na reticulação de grupos amino que pode reduzir o tamanho de poros do suporte e, conseqüentemente, a eficiência catalítica da enzima. De acordo com os valores de proteína imobilizada e atividade hidrolítica da LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS (Tabela 4.8), o derivado de glutaraldeído imobilizou três vezes mais proteína que os derivados ativados com epóxidos. No entanto, os valores de atividade hidrolítica dos derivados foram similares, mostrando que a ativação com glutaraldeído reduz o tamanho do diâmetro de poro do suporte.

Estes resultados mostram claramente que a modificação da quitosana com TNBS aumentou a hidrofobicidade do polieletrólito selecionado quitosana-alginato, tornando atrativa a sua aplicação como suporte para a imobilização de lipases e posterior aplicação do biocatalisador em reações em meios anidros.

Também foi realizado um ensaio controle empregando hidrogel híbrido quitosana-alginato-TNBS submetido à oxidação com periodato de sódio (item 3.2.6.6), sem etapa de ativação com os agentes glicidol, epícloridrina e glutaraldeído, como suporte alternativo na imobilização de LTL. A imobilização de LTL foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.2.8.6. Íons periodato (IO_4^-) atacam dióis vicinais presentes na estrutura de alguns biopolímeros de natureza glicosídica tais como alginato, quitosana, carragenina. A clivagem do anel glicosídico resulta na formação de um dialdeído que pode ser utilizado como matriz para a imobilização de enzimas (Vold e Christensen, 2005). Esses biopolímeros funcionalizados com íons periodato como quitosana tem sido empregados na imobilização de enzimas. Entretanto, a oxidação com íons periodato aumenta a flexibilidade do biopolímero e a sua solubilidade devido à despolimerização do material. A reticulação de grupos hidroxila e amino desses materiais por agentes bifuncionais impede o ataque dos íons periodato sobre estes grupos presentes no anel glicosídico do suporte e, conseqüentemente a solubilização da matriz (Vold e Christensen, 2005). O suporte quitosana-alginato-TNBS não ativado foi submetido à oxidação com solução de periodato de sódio na concentração de 300 μmoles de periodato. g^{-1} de suporte e empregado na imobilização de LTL, porém quase todo o hidrogel híbrido oxidado com periodato foi solubilizado nas condições adotadas de imobilização (pH 10,05). A solubilização do suporte não ocorreu quando foi submetido à

etapa de ativação com agentes bifuncionais como glicidol, epícloridrina e glutaraldeído. A ativação de quitosana-alginato-TNBS com estes agentes confere maior estabilidade química e mecânica ao suporte, atendendo, assim, um dos mais importantes pré-requisitos para a aplicação de um suporte como matriz de imobilização de enzimas, a sua insolubilidade.

De acordo com a estimativa da porcentagem de grupos amino reticulados, nota-se que a epícloridrina, um agente bifuncional com grupo epóxido e amplamente empregado na reticulação de grupos hidroxila de suportes orgânicos (Gonçalves et al., 2005; Fangkangwanwong al., 2006) reagiu com grupos amino do suporte, mostrando que a reação da epícloridrina não ocorre somente com os grupos hidroxila. Glutaraldeído reage preferencialmente com grupos amino da quitosana na formação de bases de Schiff ($-C=N$) e glicidol mostrou ter reagido somente com os grupos hidroxila do suporte.

É importante salientar que a utilização desses agentes na etapa de ativação, além de inserir grupos reativos com a enzima no suporte, também tem a função de reticular o suporte, conferindo maior resistência ao suporte. Os resultados obtidos mostram que a reticulação e/ou ativação com agentes bifuncionais é uma importante ferramenta para o emprego de matrizes híbridas de quitosana na imobilização de enzimas por ligação covalente multipontual.

4.1.4.2. Influência do Tempo de Imobilização e Redução com Borohidreto de Sódio

Foi investigado o efeito do tempo de imobilização para LTL imobilizada no suporte selecionado quitosana-alginato modificado quimicamente com TNBS e ativado por diferentes protocolos. Os ensaios foram realizados como descrito no item 3.2.8.6. Os resultados obtidos quando se variou o tempo de imobilização de 12 para 24 h estão sumarizados na Tabela 4.10.

Observa-se que, embora a concentração de proteína imobilizada tenha sido similar em 12 e 24 h, as atividades hidrolíticas dos derivados imobilizados em 24 h foram 24% (ativado com glutaraldeído) e 40% (ativado com glicidol e epícloridrina) menores que os derivados imobilizados em 12 h e sem redução com borohidreto de sódio. Por outro lado, esperava-se que com o aumento do tempo de imobilização houvesse aumento da estabilização

dos derivados, porém isso não ocorreu. A distribuição das lisinas na superfície de LTL deve ser responsável por esse comportamento, já ocorrido e explicado na produção de outros derivados. Assim, tempo de imobilização de 12 h foi selecionado.

Verificou-se também a influência da redução das bases de Schiff com NaBH₄ sobre a atividade hidrolítica e estabilidade térmica dos derivados e os resultados obtidos também são apresentados na Tabela 4.10. Bases de Schiff (ligação dupla C = N) são formadas entre o grupo aldeído do suporte e os grupos amino da enzima (Palomo et al., 2005). A redução das bases de Schiff para transformá-las em ligações covalentes estáveis, bem como a redução dos grupos aldeído remanescentes no suporte após a imobilização, que voltam a ser grupos hidroxilas inertes é uma etapa importante no processo de imobilização (Palomo et al., 2005).

Tabela 4.10. Influência do tempo de imobilização e da redução com borohidreto de sódio sobre os parâmetros de imobilização de LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativado por diferentes protocolos. Carga enzimática oferecida de 5 mg proteína.g⁻¹ de gel (956 U. g⁻¹ de gel).

Tempo de Imobilização	Agente de Ativação	Redução com NaBH ₄	AH _{der} (U.g ⁻¹ de gel)	PI (mg.g ⁻¹ gel)	AR (%)	t _{1/2} (h)	FE
12 h	GLI	Não	234,6	1,81	67,8	3,93	45,3
	EPI	Não	217,0	1,84	61,7	3,99	45,2
	GLU	Não	213,7	3,54	32,6	3,89	44,2
	GLI	Reduzido	207,9	1,91	56,9	3,22	37,1
	EPI	Reduzido	178,6	1,87	49,9	3,33	38,4
	GLU	Reduzido	164,9	3,61	23,9	3,01	34,7
24 h	GLI	Não	147,9	1,74	47,7	3,90	43,3
	EPI	Não	126,0	1,73	44,5	4,09	48,7
	GLU	Não	164,4	3,69	29,2	3,80	42,2
	GLI	Reduzido	121,9	1,81	35,2	3,37	38,9
	EPI	Reduzido	111,4	1,84	31,7	3,42	39,4
	GLU	Reduzido	137,9	3,78	19,1	2,78	32,1

AH_{der}: atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Proteína imobilizada (mg.g⁻¹ de suporte); AR: Atividade recuperada (%); t_{1/2}: tempo de meia-vida (h) e FE: Fator de estabilidade.

As atividades determinadas para os derivados foram de 11 a 23% menores após a etapa de redução, para todos os agentes de ativação empregados. No entanto, para os derivados ativados com glutaraldeído esta redução foi mais significativa, mostrando que maior número de bases de Schiff foi alcançado com esse agente de ativação. De acordo com a literatura, a perda de atividade dos derivados após redução com NaBH₄ tem sido relacionada com a redução das pontes de dissulfeto na estrutura da enzima (Brígida et al., 2007; Rodrigues et al., 2008). Rodrigues et al. (2008) avaliaram as influências da temperatura (4 e 25 °C) e da concentração de NaBH₄ (0,5 e 1,0 mg.mL⁻¹ de suspensão) sobre a atividade hidrolítica de CALB imobilizada em glioxil-agarose. Esses autores observaram que a atividade hidrolítica dos derivados não foi afetada após a redução realizada a baixa temperatura e baixa concentração de NaBH₄, mas observaram perda de atividade quando a etapa foi realizada nas mesmas condições experimentais utilizadas neste trabalho (25° C, 1,0 mg.mL⁻¹ de suspensão). Recomenda-se assim que a redução seja realizada a 4 °C utilizando 0,5 mg.mL⁻¹ de NaBH₄. A estabilidade térmica dos derivados obtidos neste trabalho também foi menor após redução com NaBH₄ e os resultados estão de acordo com os relatados na literatura para CALB imobilizada em glioxil-fibra de coco verde (Brígida et al., 2007).

4.1.4.3. Modificação Química do Hidrogel Quitosana-Alginato com Laurinaldeído

As lipases mostram elevada afinidade por suportes modificados quimicamente por agentes hidrofóbicos (Bastida et al., 1998; Palomo et al., 2002; Mendes et al., 2006). A reação dos grupos amino da quitosana com laurinaldeído é responsável pela inserção de cadeias alifáticas com 12 átomos de carbono na superfície do suporte, alterando a hidrofobicidade do suporte. Objetivou-se, com a utilização de laurinaldeído como agente de modificação química, alterar o microambiente do suporte para favorecer o processo de imobilização da enzima como agente alternativo ao TNBS. Para avaliar este efeito, variou-se a concentração de laurinaldeído de 1 a 5% empregando o complexo polieletrólítico selecionado quitosana-alginato e ativado com glicidol e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Influência da concentração de laurinaldeído sobre os parâmetros de imobilização da lipase LTL imobilizada em quitosana-alginato ativado com glicidol. Carga enzimática oferecida de 5 mg de proteína.g⁻¹gel (956 U. g⁻¹de gel).

Porcentagem (% m.m ⁻¹)	Parâmetros de Imobilização				
	AH _{der} (U.g ⁻¹ de gel)	PI (mg.g ⁻¹ gel)	AR (%)	t _{1/2} (h)	FE
1	54,8	1,06	22,7	1,18	18,0
3	71,2	1,18	29,1	1,58	24,2
5	87,7	1,36	36,4	1,59	24,5

AH_{der}: atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Proteína imobilizada (mg.g⁻¹ de suporte); AR: Atividade recuperada (%); t_{1/2}: tempo de meia-vida (h) e FE: Fator de estabilidade.

Como esperado, o aumento da concentração de laurinaldeído aumentou também a atividade hidrolítica e, conseqüentemente, a atividade recuperada de LTL imobilizada. O aumento de 1 para 5% não aumentou consideravelmente a concentração de proteína imobilizada, indicando que um novo aumento na concentração do aldeído não conduziria a uma melhoria significativa na imobilização de proteína. O valor de proteína imobilizada obtida utilizando quitosana-alginato modificada com laurinaldeído na concentração de 5% foi semelhante ao hidrogel quitosana-alginato-TNBS, mas a atividade hidrolítica dos derivados obtidos com este agente, bem como o fator de estabilidade, foram inferiores aos obtidos com TNBS (Tabela 4.8). Portanto, neste caso, a lipase mostrou ter mais afinidade pelo complexo eletrolítico modificado quimicamente com TNBS, sendo mais eficaz para promover a formação de um microambiente mais favorável à enzima.

4.1.4.4. Efeito de Carga Máxima de Proteína sobre os Parâmetros de Imobilização de LTL Imobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS

Para a determinação da carga máxima de proteína que poderia ser utilizado na imobilização de LTL em quitosana-alginato-TNBS ativado por diferentes protocolos, a carga de proteína oferecida variou de 5 a 50 mg.g⁻¹ de gel e os resultados são apresentados na Tabela 4.12. Os ensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia apresentada no item 3.2.8.6.

Tabela 4.12. Parâmetros de imobilização obtidos para diferentes cargas de proteína oferecida para quitosana-alginato-TNBS ativada por diferentes protocolos. Atividade enzimática de LTL de 191,2 U.mg⁻¹ de proteína.

Proteína (mg.g ⁻¹)	Glicidol			Epícloridrina			Glutaraldeído		
	AH _{der} (U.g ⁻¹ de gel)	PI (mg.g ⁻¹ gel)	AR (%)	AH _{der} (U.g ⁻¹ de gel)	PI (mg.g ⁻¹ gel)	AR (%)	AH _{der} (U.g ⁻¹ de gel)	PI (mg.g ⁻¹ gel)	AR (%)
5	234,6	1,81	67,8	217,0	1,84	61,7	213,7	3,55	31,0
10	243,2	3,79	33,5	220,8	3,80	30,4	243,2	6,40	20,7
30	307,0	6,08	26,4	310,4	6,34	25,6	288,0	15,4	10,1
50	352,2	7,76	18,5	364,8	7,65	19,1	297,6	17,5	9,17

AH_{der}: atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Proteína imobilizada (mg.g⁻¹ de suporte); AR: Atividade recuperada (%).

Para a carga máxima de proteína oferecida (50 mg.g⁻¹ de gel), o hidrogel ativado com glutaraldeído imobilizou 17,5 mg de proteína.g⁻¹ de gel, para o polieletrólito ativado por agentes epóxidos (glicidol e epícloridrina) a máxima concentração de proteína imobilizada foi de 7,76 e 7,65 mg.g⁻¹ de gel, respectivamente. No entanto, a maior atividade da enzima imobilizada foi obtida para o hidrogel ativado com epícloridrina (364,8 U.g⁻¹ de gel). A alta reatividade do glutaraldeído pode ser responsável por este resultado, com comportamento similar à enzima imobilizada em gel de agarose. É possível que, nestas condições, o suporte ativado com este agente provocou distorções na estrutura tridimensional da enzima, levando a uma conformação inativa de muitas moléculas da enzima ou uma má orientação da proteína imobilizada impedindo o acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima. Efeitos difusivos também podem ser responsáveis pela menor atividade da enzima imobilizada.

A atividade recuperada diminuiu com o aumento da carga de proteína para todos os derivados, observando-se reduções maiores para os derivados ativados com glutaraldeído. O valor deste parâmetro diminuiu de quase 31% para o ensaio de menor carga de enzima oferecida (5 mg.g⁻¹ de gel) para menos de 10% com o carregamento máximo oferecido (50 mg.g⁻¹ de gel). A atividade enzimática do derivado aumenta com o aumento da carga de proteína e a velocidade de difusão do substrato nos interstícios do gel pode diminuir com a presença de mais moléculas de proteína imobilizada por redução do diâmetro de poro da matriz (Gomes et al., 2004; Rodrigues et al., 2008). De acordo com os resultados (Tabela

4.12), observa-se que oferecimento acima de 50 mg de proteína.g⁻¹ de gel não deve conduzir a melhorias significativas dos parâmetros de imobilização.

Para a lipase LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS, a máxima atividade hidrolítica e a estabilidade térmica dos derivados foram similares para os três tipos de agentes de ativação testados. Conforme já constatado para os outros suportes, a maior quantidade de proteína imobilizada foi obtida quando o suporte foi ativado com glutaraldeído, mas com menor atividade recuperada.

4.1.4.5. Influência da Temperatura sobre a Atividade Hidrolítica de LTL Solúvel e Imobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS

A influência da temperatura na atividade hidrolítica das lipases imobilizadas e solúveis foi determinada na faixa de 30-90 °C (item 3.2.10.1). Os resultados são mostrados na Figura 4.12. Como se pode observar, a temperatura máxima de atividade hidrolítica para a enzima solúvel foi de 60 e de 65 °C quando a lipase foi imobilizada em quitosana-alginato-TNBS-glutaraldeído e de 70 °C para os derivados obtidos por ativação com glicidol e epícloridrina. Esses resultados confirmam que a imobilização conduziu a um aumento na rigidez da estrutura proteica da enzima, que é normalmente observado devido ao aumento da estabilidade térmica da enzima. Quitosana-alginato-TNBS ativado por compostos glicidol e epícloridrina permitiu maior estabilidade à temperatura elevada do que o derivado ativado com glutaraldeído.

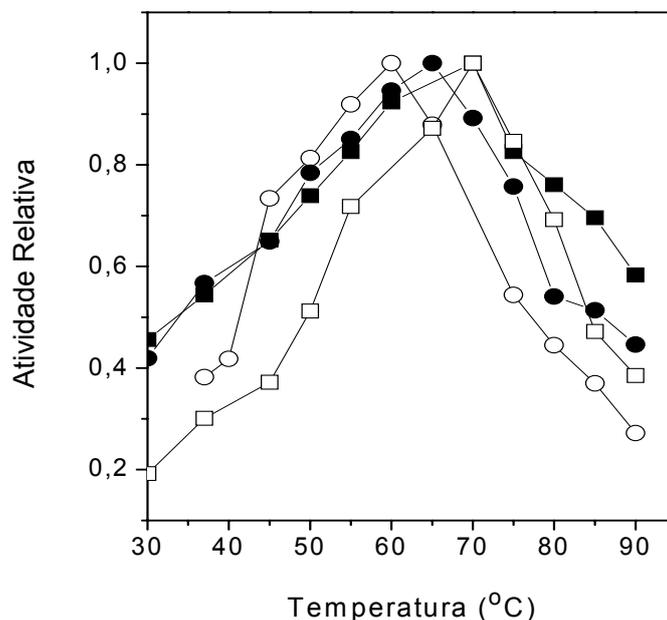


Figura 4.12. Influência da temperatura na atividade hidrolítica de LTL solúvel (○) e immobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativada com glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●).

4.1.4.6. Influência do pH sobre a Atividade Hidrolítica de LTL Solúvel e Immobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS

O pH do meio pode afetar a estrutura tridimensional da enzima, bem como as cargas iônicas dos resíduos da enzima que catalizam a reação e o caráter iônico dos substratos. A imobilização pode alterar o microambiente da enzima e, conseqüentemente, alterar a atividade hidrolítica do biocatalisador. O efeito do pH sobre a atividade de hidrólise da lipase solúvel e immobilizada em quitosana-alginato-TNBS foi analisado na faixa de pH de 5,0-9,0 na temperatura ótima previamente determinada para cada sistema, 60 °C para a lipase solúvel, 65 °C para o derivado ativado com glutaraldeído e a 70 °C para os derivados ativados com glicidol e epicloridrina. Os ensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.10.2. Os resultados são apresentados na Figura 4.13.

Conforme apresentado na Figura 4.13, a lipase solúvel e immobilizadas revelaram atividades máximas em pH 8,0. Lipase immobilizada em hidrogel ativado com

glutaraldeído foi muito mais estável na região ácida do que na região alcalina. Lipase solúvel e imobilizada em suporte ativado com agentes epóxidos foram mais estáveis na região alcalina. Para valores de pH superior a 9,0, a lipase solúvel foi mais estável que os derivados. Esperava-se que a imobilização de uma enzima em um suporte de caráter iônico iria causar mudanças do pH ótimo da enzima. Geralmente, a imobilização de uma enzima em suporte iônico resulta na mudança no pH ótimo da enzima (Pereira et al., 2003). No entanto, este comportamento não foi observado, provavelmente devido à modificação química pelo TNBS.

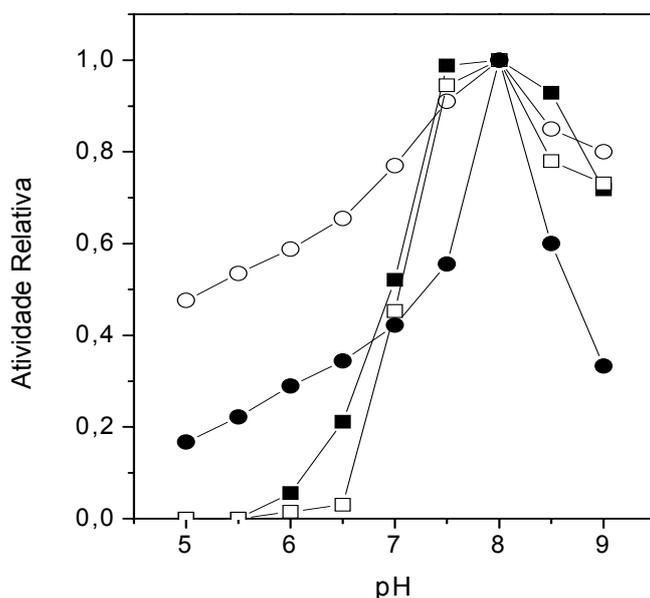


Figura 4.13. Influência da temperatura na atividade hidrolítica de LTL solúvel (○) e imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativada com glicidol (■), epicloridrina (□) e glutaraldeído (●).

4.1.4.7. Síntese de Butirato de Butila por LTL Imobilizada em Quitosana-Alginato-TNBS

Os derivados selecionados de LTL imobilizados em quitosana-alginato-TNBS foram empregados em reações em meio orgânico na síntese do éster aromatizante butirato de butila. A reação foi conduzida em meio de heptano, conforme metodologia descrita no item 3.2.3, por 24 h e os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 4.13.

Os maiores valores de conversão em butirato de butila foram alcançados para LTL imobilizada em glioxil-quitosana-alginato-TNBS (ativação via glicidol e epícloridrina), entre 55,8 e 57,4 mM. A conversão em butirato de butila para o derivado preparado por ativação com glutaraldeído também foi inferior aos derivados glioxil, resultados similares aos obtidos para LTL imobilizada em agarose. Esses resultados mostram que LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS apresentou um bom desempenho em reações em meio orgânico, sendo também promissor para a síntese de biodiesel.

Tabela 4.13. Síntese de butirato de butila catalisada por LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativada por diferentes protocolos.

Agente de Ativação	Butirato de Butila (mM) ^{24 h}
GLI	57,4
EPI	55,8
GLU	42,9

4.1.5. Imobilização de LTL em Poli-(hidróxibutirato) (PHB) Ativado por Diferentes Agentes

PHB foi utilizado como matriz de imobilização covalente da lipase LTL ativado por diferentes protocolos. Sua aplicação na imobilização de enzimas não é relatada na literatura e por se tratar de um suporte de baixo custo foi empregado na preparação de derivados de LTL e os parâmetros de imobilização destes derivados estão sumarizados na Tabela 4.14. Os ensaios foram realizados como descrito no item 3.2.8.6.

Tabela 4.14. Imobilização de lipase microbiana LTL em PHB ativado por diferentes protocolos. Carga enzimática oferecida de 5 mg proteína.g⁻¹ de suporte (atividade oferecida = 956 U.g⁻¹ de suporte).

Ativação	Parâmetros de Imobilização				
	AH _{der.} (U.g ⁻¹ de suporte)	PI (mg.g ⁻¹ de suporte)	AR (%)	t _{1/2} (h)	FE
GLI	76,7	0,99	40,7	1,47	22,5
GLU	76,8	1,74	23,1	1,06	16,2

AH_{der.}: atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Proteína imobilizada (mg.g⁻¹ de suporte); AR: Atividade recuperada (%); t_{1/2}: tempo de meia-vida (h) e FE: Fator de estabilidade.

A ativação do PHB com epícloridrina não foi possível porque o PHB é bastante solúvel em epícloridrina. De acordo com os dados apresentados, os valores de atividade enzimática dos derivados preparados empregando glioxil-PHB ativado com glicidol e glioxil-amino-PHB ativado com glutaraldeído foram bastante similares, da ordem de 77,0 U.g⁻¹ de suporte. Apesar dos valores de atividade hidrolítica terem sido similares, a atividade recuperada do derivado glioxil foi quase duas vezes superior ao derivado preparado por ativação com glutaraldeído (23,1%), em razão da maior limitação difusional do derivado ativado com glutaraldeído que imobilizou maior concentração de proteína. A concentração de proteína imobilizada em suporte glioxil-PHB foi similar aos valores obtidos para a LTL imobilizada em glioxil-agarose 6BCL e em glioxil-quitosana-alginato-TNBS, aproximadamente 30% da atividade oferecida inicialmente foi imobilizada. O tempo de meia-vida do derivado preparado em glioxil-amino-PHB ativado com glutaraldeído foi de 1,06 h, ligeiramente inferior ao derivado preparado por ativação com glicidol (1,47 h). Os valores de atividade hidrolítica obtidos com a imobilização covalente em PHB são inferiores aos obtidos com agarose e quitosana.

4.1.6. Imobilização de Lipase em Bagaço de Cana-de-Açúcar Ativado por Diferentes Agentes

O uso de materiais lignocelulósicos como matriz de imobilização de lipases é bastante relatado na literatura (Freitas et al., 2003; Perez et al., 2007). A principal característica destes compostos é o grande número de grupos hidroxila que são importantes no processo de ativação da matriz via glioxil, por agentes bifuncionais como glicidol e epícloridrina, que reagem preferencialmente com grupos hidroxila do suporte. Os materiais lignocelulósicos possuem estrutura química bastante similar à quitina e quitosana, o que difere entre eles é a presença de grupos amino presentes na estrutura da quitina e quitosana. No presente trabalho foi utilizado o bagaço de cana como matriz para a imobilização de LTL, um suporte de baixo custo proveniente do setor sucro-alcooleiro alternativo à quitosana, e os parâmetros de imobilização dos derivados preparados estão sumarizados na Tabela 4.15.

A utilização do bagaço de cana como matriz de imobilização da lipase em estudo permitiu obter derivados com elevada atividade hidrolítica. O suporte ativado com glicidol e epícloridrina apresentou atividade hidrolítica ligeiramente inferior à quitosana-alginato-TNBS (Tabela 4.8). O suporte ativado com glicidol e epícloridrina obteve atividade hidrolítica de 183,6 e 191,8 U.g⁻¹ de gel, respectivamente. O suporte ativado com glutaraldeído apresentou baixa atividade hidrolítica (79,5 U.g⁻¹ de gel) devido à alta reatividade deste agente em pH alcalino que provocou menor acesso do substrato aos sítios ativos da enzima causado por efeitos difusivos ou distorção da estrutura ativa da enzima após a imobilização.

Tabela 4.15. Imobilização de LTL em bagaço de cana ativado por diferentes protocolos. Carga enzimática oferecida de 5 mg proteína.g⁻¹ de suporte (atividade oferecida = 956 U.g⁻¹ de suporte).

Ativação	Parâmetros de Imobilização				
	AH _{der.} (U.g ⁻¹ de suporte)	PI (mg.g ⁻¹ de suporte)	AR (%)	t _{1/2} (h)	FE
GLI	183,6	1,27	75,5	1,16	17,7
EPI	191,8	1,27	78,8	1,25	19,1
GLU	79,5	1,97	21,1	0,87	13,2

AH_{der.}: atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Proteína imobilizada (mg.g⁻¹ de suporte); AR: Atividade recuperada (%); t_{1/2}: tempo de meia-vida (h) e FE: Fator de estabilidade.

A concentração de proteína imobilizada em derivados glioxil-bagaço também foi similar aos derivados de LTL imobilizados em agarose e em quitosana-alginato-TNBS, próximo a 30% da proteína inicialmente oferecida. Para o suporte ativado com glutaraldeído, a concentração de lipase imobilizada foi de apenas 40% da enzima inicialmente oferecida, inferior aos resultados obtidos para a LTL imobilizada em glioxil-amino-agarose-glutaraldeído (100%) e quitosana-alginato-TNBS-glutaraldeído (70%), conforme mostrado na Tabela 4.8.

A imobilização de LTL em quitosana-alginato-TNBS estabilizou termicamente os derivados preparados 45 vezes em relação à enzima solúvel a 70 °C. Com os derivados imobilizados em bagaço de cana, esta estabilização foi cerca de 50% menor. Os maiores fatores de estabilidade obtidos para o bagaço de cana foram obtidos para os derivados

ativados com epiclorigrina e glicidol, entre 17 e 19 vezes, respectivamente. Resultados similares foram relatados na literatura (Freitas et al., 2003).

4.1.7. Imobilização de Lipases em Gel Amino-Toyopearl

Lipases LTL e LPF foram imobilizadas em amino-toyopearl, uma resina acrílica disponível comercialmente com excelentes propriedades químicas e mecânicas, bastante apropriada para a obtenção de biocatalisadores de interesse industrial. A imobilização de enzimas em géis glioxil-amino-toyopearl foi realizada na presença de tensoativo Triton X-100 (Palomo et al., 2005). O suporte foi ativado por glicidol, epiclorigrina e glutaraldeído. Para este suporte não foi realizada a etapa de aminação por etilenodiamina para posterior ativação com glutaraldeído devido à presença de grupos amino no suporte. As propriedades catalíticas destes derivados preparados são mostradas na Tabela 4.16. Os ensaios foram conduzidos conforme descrito no item 3.2.8.6.

Tabela 4.16. Parâmetros de imobilização da LTL e LPF em toyopearl ativado por diferentes protocolos. Carga oferecida de 5 mg de proteína.g⁻¹ de gel. Atividade oferecida: LTL (956 U.g⁻¹ de gel) e LPF (1087,5 U.g⁻¹ de gel).

Lipase	Agente	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	t _{1/2} (h)	FE
LTL	GLI	188,4	1,62	60,9	1,92	27,0
	EPI	244,9	1,84	69,7	1,93	31,0
	GLU	169,6	5,00	17,7	1,77	21,0
LPF	GLI	44,0	1,89	10,7	0,39	5,20
	EPI	58,7	2,20	12,3	0,43	5,70
	GLU	33,4	5,00	3,07	0,31	4,00

AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%), t_{1/2} é o tempo de meia-vida e FE: fator de estabilidade.

Os derivados preparados de LTL também foram mais ativos que os preparados por LPF, comportamento semelhante à agarose. O maior valor de atividade hidrolítica de LTL foi para a enzima imobilizada em glioxil-amino-toyopearl ativado com epiclorigrina (244,9

U.g⁻¹ de gel), seguido de ativação glicidol (188,4 U.g⁻¹ de gel) e glutaraldeído (169,6 U.g⁻¹ de gel). Os valores de atividade hidrolítica de LPF dos derivados preparados por imobilização em glioxil-amino-toyopearl foram similares aos obtidos em glioxil-agarose, inferiores a 60 U.g⁻¹ de gel. A concentração de proteína imobilizada de LTL também apresentou valores semelhantes aos outros suportes testados, quando se utilizou imobilização via glioxil (glicidol e epicloridrina). Para a ativação glutaraldeído, segue o mesmo comportamento dos outros suportes testados. A imobilização de LPF em amino-toyopearl mostrou menor concentração de enzima imobilizada em comparação à agarose que foi de aproximadamente 3,5 mg de proteína.g⁻¹ de gel (Tabela 4.1), enquanto em amino-toyopearl oscilou entre 2 mg.g⁻¹ de gel (Tabela 4.16). A atividade recuperada dos derivados preparados via glioxil foi da ordem de 70%. Derivado de glutaraldeído apresentou forte limitação difusional devido à sua alta reatividade que reduz o diâmetro de poro da matriz ou também por distorção da estrutura ativa da enzima. Na imobilização de LPF, os valores de atividade recuperada também foram muito baixos, similar aos valores encontrados em agarose (Tabela 4.1).

Os dados experimentais de inativação térmica dos derivados de LTL e LPF preparados por amino-toyopearl também foram ajustados a um modelo de decaimento exponencial para a estimativa dos tempos de meia-vida e fator de estabilidade, como mostrados na Figura 4.14.

Derivados de LTL preparados com agarose foram mais estáveis que os obtidos empregando amino-toyopearl como suporte (Tabela 4.1). Derivados de LTL imobilizada em amino-toyopearl foram aproximadamente 10 vezes menos estáveis que os derivados de agarose, estabilizando entre 21 (glutaraldeído) a 31 vezes (epicloridrina) a lipase em relação à sua forma solúvel. Derivados ativados por glicidol (FE=27) e epicloridrina (FE=31) são ligeiramente mais estáveis que os ativados por glutaraldeído, com tempo de meia-vida próxima a 2,5 h (Figura 4.14A). Os valores de estabilização térmica dos derivados de amino-toyopearl foram semelhantes aos resultados de parâmetros de imobilização de LTL imobilizada em bagaço de cana (Tabela 4.15). Em relação ao custo do suporte, bagaço de cana mostra ser mais viável economicamente para a obtenção de derivados de LTL. Os derivados de LPF foram também pouco termoestáveis com resultado similar ao obtido para os derivados de LPF em agarose.

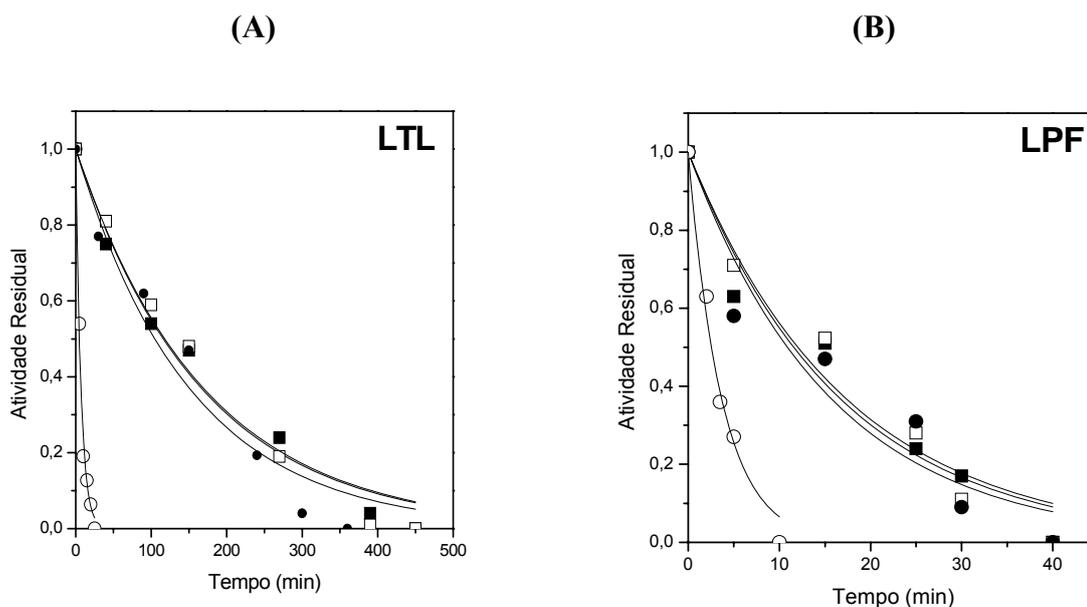


Figura 4.14. Inativação térmica das enzimas solúveis (○) e dos derivados preparados de LTL (A) e LPF (B) immobilizados em glicoxil-toyopearl ativados por glicidol (■), epiclorigidrina (□) e glutaraldeído (●) incubados a 70 °C na presença de tampão fosfato pH 8,0 100 mM.

LTL foi immobilizada em toyopearl na presença de Triton X-100, oferecendo diferentes carregamentos de proteína (5-80 mg.g⁻¹ de suporte) e os parâmetros de imobilização estão sumarizados na Tabela 4.17. A influência do carregamento de enzima sobre as propriedades catalíticas de LPF imobilizada neste suporte não foi testada.

Tabela 4.17. Parâmetros de imobilização da LTL em amino-toyopearl ativada por diferentes protocolos, para diferentes cargas enzimáticas oferecidas.

CP (mg.g ⁻¹)	Glicidol			Epicloridrina			Glutaraldeído		
	AH _{der} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)	AH _{der} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)
5	188,4	1,62	60,9	244,9	1,84	69,7	169,6	5,00	18,0
10	247,5	3,81	34,0	279,8	4,76	30,8	207,8	8,44	12,8
30	345,8	8,46	21,4	378,4	7,11	27,8	245,6	11,7	11,0
60	397,5	15,7	13,2	405,7	12,7	16,7	294,1	19,3	7,9
80	421,4	16,6	13,3	437,8	15,8	14,5	321,2	21,9	7,5

CP: Carregamento de proteína oferecida (mg de proteína.g⁻¹ de gel); AH_{der}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%).

Para o carregamento de 5 mg.g^{-1} de gel, empregado neste estudo, a recuperação de atividade e a atividade hidrolítica para o derivado ativado com epiclorigrina foi ligeiramente superior ao gel ativado via glicidol. No entanto, para os derivados obtidos com máximo carregamento, a atividade hidrolítica e a atividade recuperada foram semelhantes, com máxima atividade hidrolítica acima de 400 U.g^{-1} de gel. Observa-se também que a imobilização da lipase microbiana LTL em glioxil-amino-toyopearl gerou derivados menos ativos em relação aos de agarose (Tabela 4.2). Como verificado para os outros suportes, também para o amino-toyopearl a maior quantidade de proteína imobilizada foi obtida quando o suporte foi ativado com glutaraldeído, como sempre ($21,9 \text{ mg.g}^{-1}$ de gel) e as maiores atividades hidrolíticas foram obtidas para os géis ativados com glicidol e epiclorigrina.

Uma vez que não se obteve 100% de atividade recuperada para nenhuma concentração de enzima oferecida, não é possível afirmar que o único fenômeno que ocorre seja limitação difusional, especialmente para a ativação com glutaraldeído. Nas ativações glioxil, observa-se a redução da atividade aparente com o aumento da carga imobilizada, o que costuma ocorrer na catálise heterogênea. Quando o catalisador está presente em fase diferente do substrato a efetividade da reação diminui com o aumento do módulo de Thiele. Esse por sua vez aumenta com o aumento da concentração de enzima por volume de suporte, pois à medida que a carga enzimática imobilizada aumenta há aumento da velocidade da reação e a difusividade permanece constante ou até diminui devido ao aumento da restrição difusional nos poros do suporte. Possivelmente, a redução da atividade recuperada para ativações glioxil se deve ao aumento da limitação difusional. Foi a seguir avaliado o desempenho desses derivados na síntese de butirato de butila. Os valores de concentração de butirato de butila atingidos em 24 h de reação são mostrados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18. Síntese de butirato de butila catalisada por LTL e LPF imobilizadas em amino-toyopearl ativada por diferentes protocolos.

Lipases	Agente de Ativação	Butirato de Butila (mM)^{24 h}
LTL	GLI	66,6
	EPI	60,0
	GLU	46,2
LPF	GLI	62,2
	EPI	65,5
	GLU	49,7

Os derivados preparados por ativação glioxil (glicidol e epícloridrina) também foram mais ativos em meio orgânico que os derivados preparados por ativação glutaraldeído, apresentando comportamento similar aos resultados obtidos na reação de hidrólise de azeite de oliva. Esses derivados converteram os reagentes entre 60,0 e 66,6% em butirato de butila, valores inferiores aos obtidos por derivados de agarose, conversão próxima a 85-90%, para a mesma concentração de enzima imobilizada no meio reacional (Tabela 4.6). Derivados de glutaraldeído converteram abaixo de 50%. Derivados de LPF mostraram os menores valores de atividade hidrolítica, entretanto, em síntese orgânica apresentaram um desempenho similar à LTL, comportamento semelhante verificado para os derivados em agarose (Tabela 4.6). Assim, embora os derivados de toyopearl também tenham se mostrado viáveis para uso em meio orgânico, seu custo é ainda maior que o de agarose e como foram obtidas melhores propriedades catalíticas com agarose, não é recomendável o uso de toyopearl como suporte para a imobilização de lipases.

4.1.8. Imobilização de Lipases em Suporte Híbrido Epóxi-Quitossana-Alginato

4.1.8.1. Influência do Tempo de Imobilização Sobre as Propriedades Catalíticas de LTL Imobilizada Covalentemente em Suportes Monofuncional e Heterofuncional

Outra classe de suportes amplamente empregados na imobilização covalente de enzimas de interesse industrial são as resinas epóxi (Mateo et al., 2000; Torres et al., 2003; Mateo et al., 2007a,b). Entretanto estas resinas, disponíveis comercialmente com os nomes Eudragit e Sepabeads são de custo elevado, o que permite investigar outros suportes epóxi alternativos aos comerciais por um custo relativamente inferior. No Laboratório de Tecnologia Enzimática da UFSCar, vem se investigando, nos últimos anos, a imobilização de enzimas de interesse industrial em suportes alternativos aos disponíveis comercialmente como hidrogéis de quitossana em substituição à agarose. Neste sentido, hidrogéis híbridos de quitossana-alginato, selecionado anteriormente como melhor suporte para a imobilização de LTL, também foi empregado na síntese de matriz epóxi. O mecanismo de imobilização de enzimas em suportes epóxi é diferente da imobilização de enzimas em géis glioxil. Uma

grande diferença é que na imobilização via glioxil os suportes apresentam caráter hidrofílico, enquanto na imobilização de enzimas em matrizes epóxi é necessária a utilização de matrizes hidrofóbicas para forçar a adsorção hidrofóbica da enzima. Após longos períodos de imobilização, são efetuados enlaces entre a enzima e o suporte. Na imobilização via epóxi, vários grupos reativos da enzima tais como hidroxila, sulfeto e amino atacam nucleofilicamente os grupos epóxi do suporte, ao contrário da imobilização via glioxil, na qual os enlaces entre a enzima e o suporte são efetuados apenas pelos grupos amino (Mateo et al., 2007a,b).

Por estas razões, Lipase LTL foi imobilizada em suporte monofuncional epóxi-quitosana-alginato e em suporte heterofuncional epóxi-tiol-quitosana-alginato em diferentes tempos de imobilização (12, 24, 48 e 72 h), empregando carregamento de proteína de 5 mg.g^{-1} de gel com o objetivo de verificar a influência do tempo de imobilização sobre a estabilidade térmica dos derivados incubados a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ (item 3.2.4). Os perfis de inativação são mostrados na Figura 4.15.

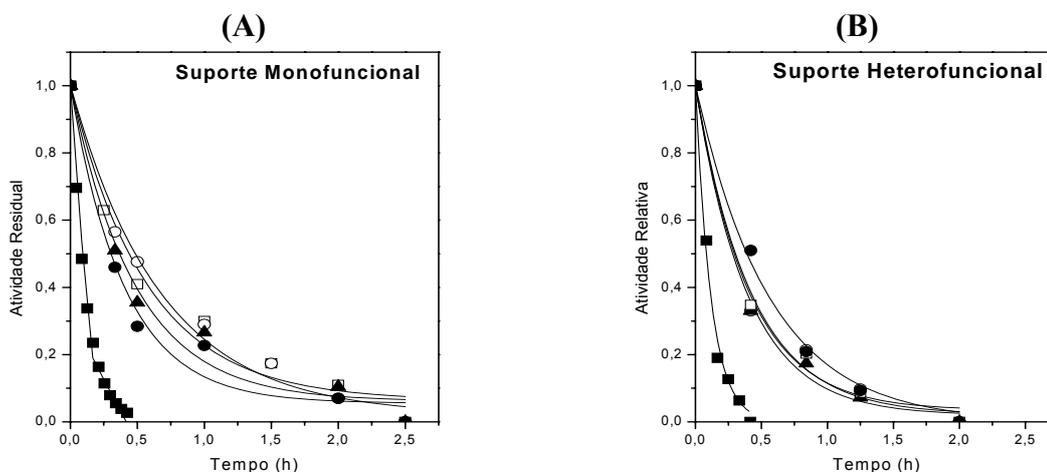


Figura 4.15. Estabilidade térmica de derivados de LTL imobilizados em suporte epóxi-(A) e tiol-epóxi-(B) por 12 (○), 24 (▲), 48 (●) e 72 h (□) e da lipase solúvel (■).

Vale ressaltar que durante a síntese do suporte monofuncional epóxi-quitosana-alginato os grupos amino da quitosana foram reticulados com anidrido acético e os grupos hidroxila da matriz híbrida foram reticulados com epícloridrina em meio de N,N -dimetilformida (Fangkangwanwong et al., 2006). Na reação de epícloridrina com os grupos hidroxila da matriz ocorre a reticulação intra e intermolecular desses grupos e a inserção de

grupos epóxi, necessários para a imobilização de enzimas. Na síntese de suporte heterofuncional epóxi-tiol-quitosana-alginato alguns grupos epóxi do suporte foram modificados quimicamente com agente tiolado, DTT (ditiotreitól), para a inserção de grupos sulfidrilas no suporte e verificar o efeito dessa modificação química sobre os parâmetros de imobilização de LTL nesta nova matriz de imobilização sintetizada pelo grupo. A concentração de grupos epóxi, também chamado de grupos oxirano, na matriz monofuncional foi de 220 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ de suporte em base úmida e após a modificação química com DTT, a concentração de grupos epóxi foi reduzida para 160 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ de suporte.

Após a etapa de imobilização da enzima, os derivados preparados foram incubados em solução de glicina 3M pH 8,0 por 24 h. Essa incubação foi realizada para todos os derivados de lipases em epóxi-quitosana-alginato, visando tornar inertes todos os grupos epóxi reativos do suporte que não efetuaram enlaces com os grupos reativos da enzima. Desta forma, durante o período de estocagem, possíveis interações enzima/suporte capazes de promover efeitos prejudiciais aos derivados, como por exemplo, a distorção do sítio ativo da enzima que poderia causar diminuição de sua estabilidade ou até mesmo sua inativação, seriam evitadas.

Para a LTL imobilizada em epóxi-quitosana-alginato, a inativação total foi observada após 2,5 h de incubação a 70 °C. Os derivados imobilizados em suporte tiolado, a inativação ocorreu após 2 h de incubação. De acordo com a Figura 4.15, o aumento do tempo de contato enzima-suporte não influenciou fortemente a estabilização dos biocatalisadores, o que mostra que não ocorreu aumento da multi-interação entre enzima e suporte.

O fator de estabilidade, relação entre o tempo de meia-vida da enzima imobilizada com a enzima livre, obtido para os derivados imobilizados em epóxi-quitosana-alginato foi de 6,0 a 7,8, aproximadamente o dobro dos derivados imobilizados em suporte tiolado, como mostrado nas Tabelas 4.19 e 4.20. Enzima imobilizada em resinas epóxi apresenta baixa estabilidade, se comparados com géis glioxil-agarose (Mateo et al., 2000). Penicilina G acilase (PGA) imobilizada em epóxi-Sepabeads e bloqueada com glicina foi apenas cerca de nove vezes mais estável que a PGA solúvel (Mateo et al., 2000), mostrando que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.

Tabela 4.19. Parâmetros de imobilização da lipase LTL em hidrogel epóxi-quitosana-alginato. Carga oferecida de 5 mg de proteína.g⁻¹ de gel. Atividade hidrolítica oferecida de 956 U.g⁻¹ de gel.

TI (h)	AH_{der.} (U.g⁻¹)	PI (mg.g⁻¹)	AR (%)	t_{1/2} (min)	FE
12	380,8	2,71	73,5	30,0	6,0
24	305,8	2,60	61,5	29,5	6,0
48	278,2	2,74	53,1	36,8	7,8
72	266,3	2,77	50,3	31,0	6,4

TI: Tempo de imobilização (h); AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel); AR: Atividade recuperada (%) e FE: Fator de estabilidade.

Tabela 4.20. Parâmetros de imobilização da lipase LTL em hidrogel epóxi-tiol-quitosana-alginato. Atividade hidrolítica oferecida de 956 U.g⁻¹ de gel.

TI (h)	AH_{der.} (U.g⁻¹)	PI (mg.g⁻¹)	AR (%)	t_{1/2} (min)	FE
12	170,2	2,24	39,8	17,8	3,7
24	175,1	2,20	41,6	16,3	3,4
48	150,7	2,21	35,4	22,5	4,7
72	143,2	2,27	33,0	17,9	3,7

TI: Tempo de imobilização (h); AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel); AR: Atividade recuperada (%) e FE: Fator de estabilidade.

O aumento do tempo de imobilização de 12 para 72 h também não influenciou na concentração de proteína imobilizada. Entretanto, pode-se observar a influência do tipo de suporte sobre a imobilização da proteína. Epóxi-quitosana-alginato foi ligeiramente superior em relação ao suporte tiolado na fixação de enzima. Uma possível explicação para este comportamento é a redução do número de grupos epóxi no suporte após a modificação com DTT.

Foi observada uma pequena redução da atividade hidrolítica dos derivados com o aumento do tempo de imobilização (Tabelas 4.19 e 4.20). Este aumento do tempo de incubação implica maior interação da enzima com o suporte, ou seja, maior número de enlaces entre enzima e suporte. Os resultados obtidos mostram que apesar do maior número de enlaces entre a enzima e o suporte com o aumento do tempo de imobilização não foi possível melhorar a estabilidade térmica dos derivados e por esta razão o tempo de imobilização adotado foi de 24 h.

4.1.8.2. Influência do Carregamento de Proteína sobre as Propriedades Catalíticas dos Derivados de LTL, LPF e Lipex® 100L Imobilizados em Matrizes Epóxi

A preparação enzimática LTL foi imobilizada em géis epóxi-quitosana-alginato e epóxi-tiol-quitosana-alginato oferecendo diferentes carregamentos de proteína (5-80 mg.g⁻¹ de suporte) e os resultados referentes aos parâmetros de imobilização estão sumarizados nas Tabelas 4.21 e 4.22.

Tabela 4.21. Parâmetros de imobilização da lipase LTL em hidrogel epóxi-quitosana-alginato. Atividade hidrolítica oferecida de 191,2 U.mg⁻¹ de proteína.

CP (mg.g ⁻¹)	AH _{der.} (U.g ⁻¹)	PI (mg.g ⁻¹)	AR (%)
5	305,8	2,60	61,5
10	427,1	4,45	50,2
30	760,0	13,7	29,2
60	1092,7	22,4	25,5
80	1257,4	25,4	26,0

CP: Carregamento de proteína oferecida (mg de proteína.g⁻¹ de gel); AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%).

Dentre os suportes epoxilados estudados, epóxi-quitosana-alginato forneceu derivados com maior atividade hidrolítica e maior atividade recuperada (Tabela 4.21). Para o ensaio conduzido com o menor carregamento de proteína (5 mg.g⁻¹ de gel), a recuperação de atividade foi de 61,9% e a atividade hidrolítica do derivado foi de 305,8 U.g⁻¹ de gel. Para os ensaios conduzidos com o carregamento de 80 mg.g⁻¹ de gel, a atividade hidrolítica para o gel epóxi-quitosana-alginato foi de 1257,4 U.g⁻¹ de gel, com atividade recuperada de 26,0%. A concentração máxima de proteína imobilizada foi de 25,4 mg.g⁻¹ de gel, quando foram oferecidos 80 mg de proteína.g⁻¹ de gel.

Para o menor carregamento de proteína (5 mg.g⁻¹ de gel), a recuperação de atividade para o suporte tiolado foi de 41,7% e a atividade hidrolítica do derivado foi de 175,1 U.g⁻¹ de gel, duas vezes menor que a atividade hidrolítica do derivado imobilizado em epóxi-quitosana-alginato, como mostrado na Tabela 4.22.

Tabela 4.22. Parâmetros de imobilização da lipase LTL em hidrogel epóxi-tiol-quitosana-alginato. Atividade hidrolítica de 191,2 U.mg⁻¹ de proteína.

CP (mg.g⁻¹)	AH_{der.} (U.g⁻¹)	PI (mg.g⁻¹)	AR (%)
5	175,1	2,20	39,8
10	308,5	4,01	40,3
30	426,8	7,71	29,0
60	479,0	11,1	22,6
80	531,7	13,5	20,6

CP: Carregamento de proteína oferecida (mg de proteína.g⁻¹ de gel); AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%).

A máxima atividade hidrolítica foi obtida com o derivado imobilizado no carregamento de 80 mg.g⁻¹ de gel, da ordem de duas vezes inferior ao alcançado no suporte epóxi-quitosana-alginato. A concentração máxima de proteína imobilizada neste suporte foi de 13,5 mg.g⁻¹ de gel, quando foram oferecidos 80 mg.g⁻¹ de gel. Este suporte forneceu menor concentração de proteína imobilizada, quase duas vezes inferior ao suporte monofuncional (não tiolado). Possivelmente, a etapa de tiolação reduziu a afinidade do suporte com a enzima, lembrando que a concentração de grupos epóxido (grupos oxirano) em epóxi-quitosana-alginato foi de 220 μmoles.g⁻¹ de gel e após a tiolação, a concentração de grupos epóxido foi de 160 μmoles.g⁻¹ de gel.

Dentre os tipos de suportes avaliados, monofuncional e heterofuncional, selecionou-se o suporte monofuncional devido às melhores propriedades catalíticas obtidas com a lipase LTL.

Após a seleção do tipo de suporte epóxi empregado, outras duas preparações enzimáticas Lipex[®] 100L e de *Pseudomonas fluorescens*, comercialmente conhecida como Lipase AK (LPF), comercializada pela Amano, foram imobilizadas em epóxi-quitosana-alginato, variando o carregamento de proteína (5-80 mg proteína.g⁻¹ de gel) para verificar a máxima concentração de proteína imobilizada e atividade máxima de hidrólise, como mostrado nas Tabelas 4.23 (LPF) e 4.24 (Lipex[®] 100L).

Tabela 4.23. Parâmetros de imobilização da lipase LPF em hidrogel epóxi-quitosana-alginato. Atividade hidrolítica de 217,5 U.mg⁻¹ de proteína.

CP (mg.g⁻¹)	AH_{der.} (U.g⁻¹)	PI (mg.g⁻¹)	AR (%)
5	150,7	3,14	22,1
10	180,6	5,48	15,2
30	223,8	11,4	9,10
60	242,1	14,4	7,70
80	272,4	15,5	9,20

CP: Carregamento de proteína oferecida (mg de proteína.g⁻¹ de gel); AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%).

Os derivados de LPF apresentaram baixa atividade hidrolítica mesmo imobilizando em epóxi-quitosana-alginato. Verifica-se na Tabela 4.6, que os derivados de LPF imobilizados em glioxil-agarose também apresentaram baixa atividade de hidrólise. A máxima concentração de proteína imobilizada foi de 15,5 mg.g⁻¹ de gel, oferecendo 80 mg de proteína.g⁻¹ de gel. A atividade hidrolítica para o derivado imobilizado em máximo carregamento, 80 mg de proteína.g⁻¹ de gel, foi quase duas vezes superior ao derivado imobilizado em baixa carga, com atividade hidrolítica máxima de 272,4 U.g⁻¹ de gel. No entanto, a atividade hidrolítica máxima obtida para a Lipex[®] 100L foi aproximadamente cinco vezes superior à LPF, como pode ser visto na Tabela 4.24.

Lipase Lipex[®] 100L imobilizada apresentou atividades de hidrólises similares à preparação lipásica LTL (Tabela 4.21). A máxima concentração de proteína imobilizada foi de 20,5 mg.g⁻¹ de gel, oferecendo 80 mg de proteína.g⁻¹ de gel, ligeiramente inferior à LTL (25,4 mg.g⁻¹ de gel). Os valores de atividade hidrolíticas foram similares para ambas as enzimas. A máxima atividade hidrolítica obtida para esta lipase foi de 1293,6 U.g⁻¹ de gel. No entanto, a atividade recuperada para os derivados de Lipex[®] 100L foram superiores aos derivados de LTL. Para os derivados de carga máxima (80 mg de proteína.g⁻¹ de gel), a atividade recuperada para a LTL e Lipex[®] 100L foi de 26 e 36,1%, respectivamente.

Tabela 4.24. Parâmetros de imobilização da lipase Lipex[®] 100L em hidrogel epóxi-quitosana-alginato. Atividade hidrolítica de 175,6 U.mg⁻¹ de proteína.

CP (mg.g⁻¹)	AH_{der.} (U.g⁻¹)	PI (mg.g⁻¹)	AR (%)
5	235,2	2,10	63,8
10	411,6	3,38	69,4
30	787,9	8,64	51,9
60	1034,9	19,3	30,5
80	1293,6	20,5	36,1

CP: Carregamento de proteína oferecida (mg de proteína.g⁻¹ de gel); AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de gel); PI: Concentração de proteína imobilizada (mg de proteína.g⁻¹ de gel) e AR: Atividade recuperada (%).

Os resultados obtidos com os suportes epóxi mostram que as atividades dos derivados de LTL foram similares às obtidas com agarose (Tabela 4.2) e para os derivados preparados Lipex[®] 100L e LPF em epóxi-quitosana-alginato, os valores e atividade hidrolítica foi superior aos derivados preparados por agarose (Tabelas 4.3 e 4.4). Enquanto se obteve fatores de estabilização superiores a 250 para a agarose, com epóxi-quitosana-alginato atingiu-se valores inferiores a oito, como mostrado nas Tabelas 4.19 (suporte monofuncional) e 4.20 (suporte heterofuncional).

Os derivados preparados de LTL em suporte monofuncional foram mais ativos que aqueles preparados em suporte heterofuncional. Talvez a modificação química de epóxi-quitosana-alginato tenha alterado o microambiente do suporte, como a hidrofobicidade, redução de diâmetro de poros ou distorção da enzima após a inserção de grupos sulfidrilas, o que acarretou a redução da atividade recuperada dos derivados.

Os derivados de LPF e Lipex[®] 100L e as lipases solúveis também foram incubados a 70 °C na presença do tampão fosfato pH 8,0 100mM e os tempos de meia-vida e o fator de estabilização foram estimados pelo ajuste de dados experimentais de inativação térmica ao modelo de decaimento não-linear de Sadana e Henley (1987), como mostrado na Figura 4.16.

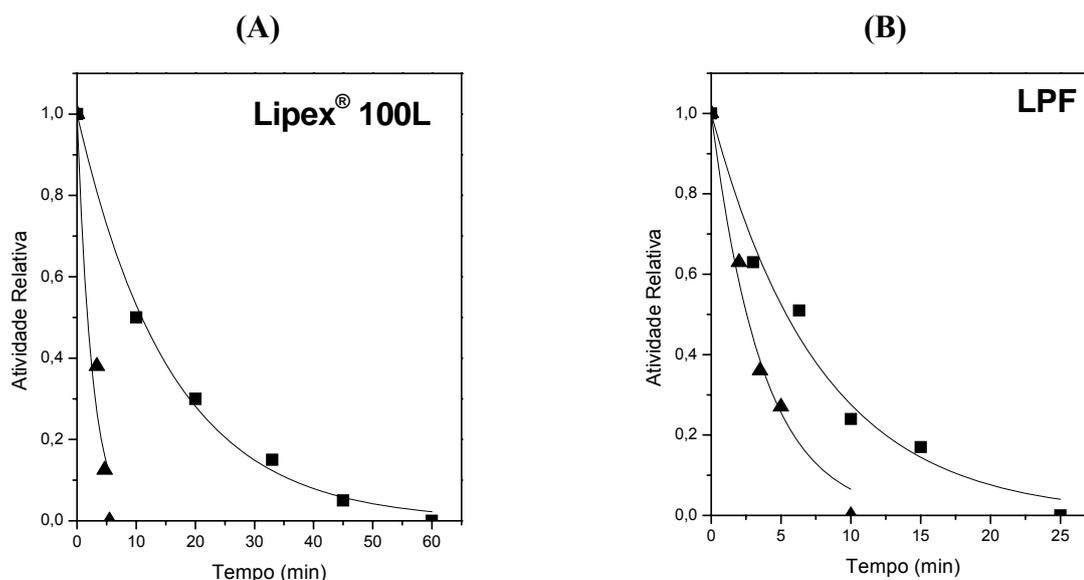


Figura 4.16. Estabilidade térmica das lipases (▲) solúveis e dos (■) derivados de Lipex® 100L (A) e de LPF (B) imobilizados por 24 h em suporte epóxi-quitosana-alginato.

Lipex® 100L foi totalmente inativada após 1 h de incubação a 70 °C. Na mesma temperatura, o derivado de LPF foi totalmente inativado em 25 min. A imobilização das lipases em epóxi-quitosana-alginato forneceu diferentes fatores de estabilização. Lipex® 100L imobilizada em epóxi-quitosana-alginato foi 6,2 vezes mais estável que a lipase na forma solúvel, com tempo de meia-vida de 11,2 min. A estabilização de LPF foi inferior à Lipex® 100L, da ordem de 2,2 vezes mais estável que a LPF solúvel, com tempo de meia-vida de 5,5 min. LTL e Lipex® 100L apresentaram fatores de estabilização próximos a 6, mostrando que o procedimento de imobilização de ambas as preparações foi importante para a estabilização da enzima. Apesar da baixa estabilidade térmica dos derivados de lipases preparados em gel epóxi-quitosana-alginato em relação aos derivados de LTL-glioxil-agarose, estes derivados se mostraram mais resistentes à ação da temperatura que a enzima solúvel, que sofreu completa inativação em apenas 5-10 min de incubação na mesma temperatura.

Os resultados obtidos com os suportes epóxi mostram que foi possível obter derivados com atividades hidrolíticas similares às obtidas com agarose e quitosana-alginato com ativação glioxil. Porém, enquanto se obteve fatores de estabilização superiores a 250 para glioxil-agarose-LTL, e de 45 para glioxil-quitosana-alginato-LTL, para os derivados epóxi-quitosana-alginato-LTL os fatores de estabilização foram inferiores a 10. Assim, entre a

ativação glioxil e epóxi, evidentemente é melhor a ativação glioxil e mesmo considerando-se o maior custo de agarose é provável que em uma análise econômica o menor custo final do produto seria obtido com agarose.

4.2. Imobilização de Lipases por Adsorção Física em Matrizes Hidrofóbicas

Outra estratégia adotada para a preparação de derivados de lipases foi a imobilização das lipases por adsorção física em matrizes hidrofóbicas de alto custo como octil-agarose, hexil-toyopearl, octadecil-sepabeads e em poli-(hidróxibutirato) (PHB). Este método de imobilização tem sido utilizado em processos de purificação de lipases presentes em caldo de fermentação (Mendes et al., 2008b) e em processos de modificação química de lipases (Fernandez-Lorente et al., 2008). Os resultados são mostrados a seguir. Este método de imobilização é muito utilizado em processos industriais porque não é necessário ativar o suporte e após a inativação da enzima o suporte pode ser empregado (Bornscheuer et al., 2002). Os ensaios foram conduzidos de acordo com metodologia apresentada nos itens 3.2.8.1 (matrizes hexil-toyopearl, octil-agarose e octadecil-sepabeads) e 3.2.8.2 (PHB).

4.2.1. Imobilização de Lipases em Matrizes Hidrofóbicas Hexil-Toyopearl, Octil-Agarose e Octadecil-Sepabeads

Lipases LTL e CALB foram imobilizadas em suportes hidrofóbicos octadecil-sepabeads, hexil-toyopearl e octil-agarose e as cinéticas de imobilização das lipases são mostradas nas Figuras 4.17 e 4.18.

Estes suportes hidrofóbicos têm sido extensivamente empregados na imobilização de lipases via adsorção física para modulação das propriedades catalíticas de lipases em reações de resolução de racematos e no processo de purificação de lipases comerciais (Bastida et al., 1998; Palomo et al., 2002). A imobilização destas lipases nessas matrizes foi realizada no Instituto de Catálisis y Petroleoquímica em Madrid-Espanha sob a

orientação do Dr. José Manuel Guisán. A atividade enzimática das lipases foi estimada na hidrólise do éster *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) em pH 7,0, conforme metodologia descrita no item 3. 2.2.1.

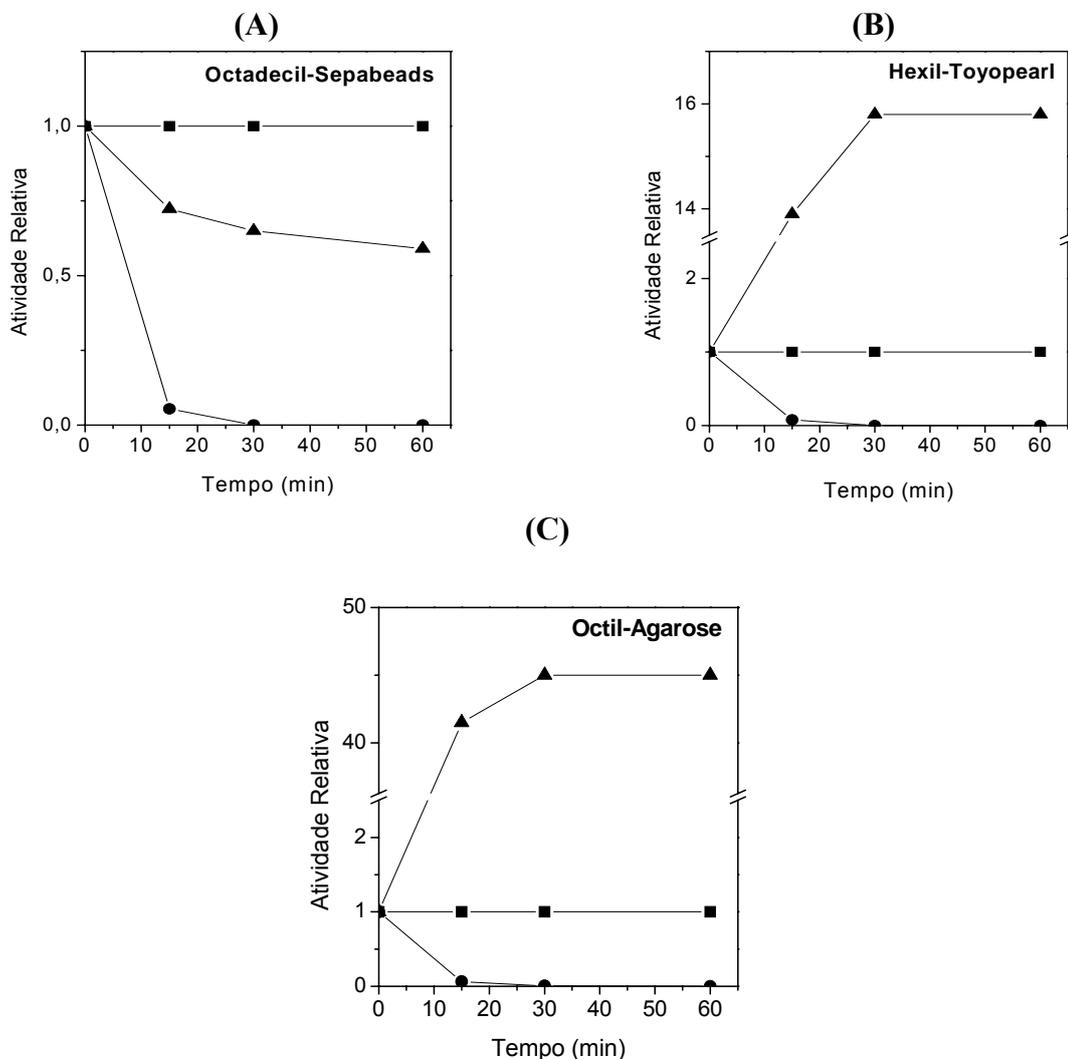


Figura 4.17. Cinética de imobilização de lipase LTL por adsorção física em suportes hidrofóbicos (A) octadecil-sepabeads, (B) hexil-toyopearl e (C) octil-agarose. (■) atividade hidrolítica do controle, (▲) suspensão e (●) sobrenadante. Imobilizações realizadas em tampão fosfato pH 7,0 5 mM a 25 °C com carregamento de proteína de 1 mg.g⁻¹ de gel.

De acordo com a Figura 4.17A, a lipase LTL imobilizada em octadecil-sepabeads sofreu redução da atividade de 41% durante a imobilização. Octadecil-Sepabeads é uma resina acrílica altamente hidrofóbica modificada quimicamente com grupos octadecil na superfície do suporte (Palomo et al., 2002).

A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é realizada pela interação entre a região do sítio ativo e o suporte e, possivelmente, neste caso, ocorreu uma forte interação entre os grupos octadecil da matriz com a enzima, distorcendo, assim, o seu sítio ativo. A imobilização de lipases em baixo carregamento em matrizes hidrofóbicas inativa a enzima por distorção da sua estrutura ativa e este comportamento é relatado na literatura para a imobilização de lipases, dentre elas LTL e CALB, em polipropileno macroporoso (Bosley e Peilow, 1997; Salis et al., 2003). No entanto, a lipase imobilizada interfacialmente em hexil-toyopearl e octil-agarose sofreu hiperativação, com aumento da atividade hidrolítica da ordem de 16-45 vezes. Para a LTL imobilizada em hexil-toyopearl, o valor de hiperativação foi de 16 vezes (Figura 4.17B) e imobilizada em octil-agarose foi aproximadamente três vezes maior que este derivado (45 vezes), como mostrado na Figura 4.17C.

O efeito de hiperativação pode ser verificado em diversas preparações de lipases (Bastida et al., 1998; Palomo et al., 2002; Mendes et al., 2008b). Bastida et al. (1998) imobilizaram diferentes preparações de lipases tais como *Candida antarctica* A, *Thermomyces lanuginosus*, *Mucor javanicus*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizopus niveus* em octil-agarose e a preparação com maior porcentagem de hiperativação foi verificada em *Thermomyces lanuginosus*, da ordem de 20 vezes, mostrando que os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com a literatura.

Lipase CALB adsorvida em octadecil-sepabeads também apresentou elevada redução da atividade hidrolítica (63%), em relação à atividade inicial, mostrando que a adsorção neste suporte afetou sensivelmente a sua atividade hidrolítica em relação à lipase LTL, como mostrado na Figura 4.18A. Para a lipase imobilizada em hexil-toyopearl e octil-agarose, esta redução da atividade foi de apenas 19 e 23%, confirmando que a natureza do suporte influencia a interação enzima/suporte (Figura 4.18B e C). Normalmente, o fenômeno de hiperativação interfacial não é verificado para derivados de CALB imobilizados por adsorção física (Bastida et al., 1998).

É importante salientar que o sítio ativo das lipases é coberto por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica “*lid*”, fazendo com que o sítio ativo esteja inacessível ao meio (conformação fechada). Na presença de uma superfície hidrofóbica, a tampa sofre uma mudança conformacional expondo o sítio ativo ao meio reacional (conformação aberta). A lipase LTL possui uma tampa hidrofóbica que cobre seu sítio ativo e para a lipase CALB, a tampa é inexistente. Isto mostra que para a lipase LTL na presença de superfície hidrofóbica,

a tampa sofre mudança conformacional, o que permite ocorrer hiperativação, pois os dímeros de lipases na presença de uma superfície hidrofóbica deslocam o equilíbrio para a conformação aberta e, conseqüentemente, há um aumento da atividade da lipase. Por esta razão, a atividade catalítica de lipase CAL B se assemelha a uma esterase e a lipase LTL a uma lipase “verdadeira”. Palomo et al. (2003) verificaram por filtração em gel que a lipase LTL se apresenta na forma bimolecular, em meios isentos de detergentes e baixa força iônica. No entanto, na lipase CALB, esta estrutura bimolecular não foi verificada, mesmo em altas concentrações de enzima decorrente da ausência da tampa hidrofóbica, mostrando que o fenômeno de hiperativação não ocorre com a CALB.

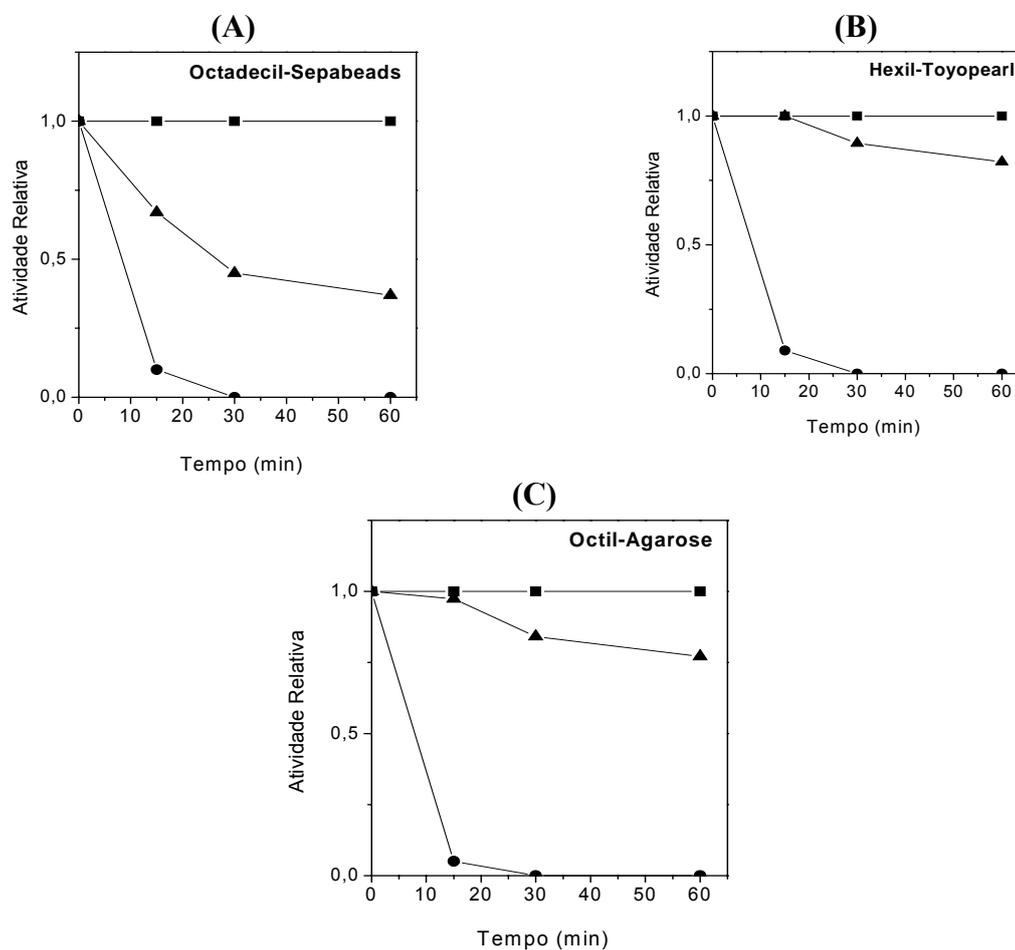


Figura 4.18. Cinética de imobilização de lipase CALB por adsorção física em suportes hidrofóbicos (A) octadecil-sepabeads, (B) hexil-toyopearl e (C) octil-agarose. (■) atividade hidrolítica do branco, (▲) suspensão e (●) sobrenadante. Imobilizações realizadas em tampão fosfato pH 7,0 5 mM a 25 °C com carregamento de proteína de 1 mg.g⁻¹ de gel).

Preparações de lipases produzidas por fermentação em escala laboratorial têm sido purificadas por adsorção da lipase em suportes hidrofóbicos como octil-agarose. Lipase de *Bacillus thermocatenuatus* não é disponível comercialmente e a estratégia de imobilização em octil-agarose foi empregada para a purificação da lipase do caldo fermentativo (Mendes et al., 2008b).

Os derivados de lipases CALB, BTL2 e LTL imobilizados por adsorção física foram incubados a 70 °C e determinada a influência do tipo de suporte hidrofóbico sobre a estabilidade térmica dos derivados incubados em pH 7,0 25 mM, conforme mostrado na Figura 4.19. Neste estudo, a lipase BTL2 foi imobilizada somente em octil-agarose.

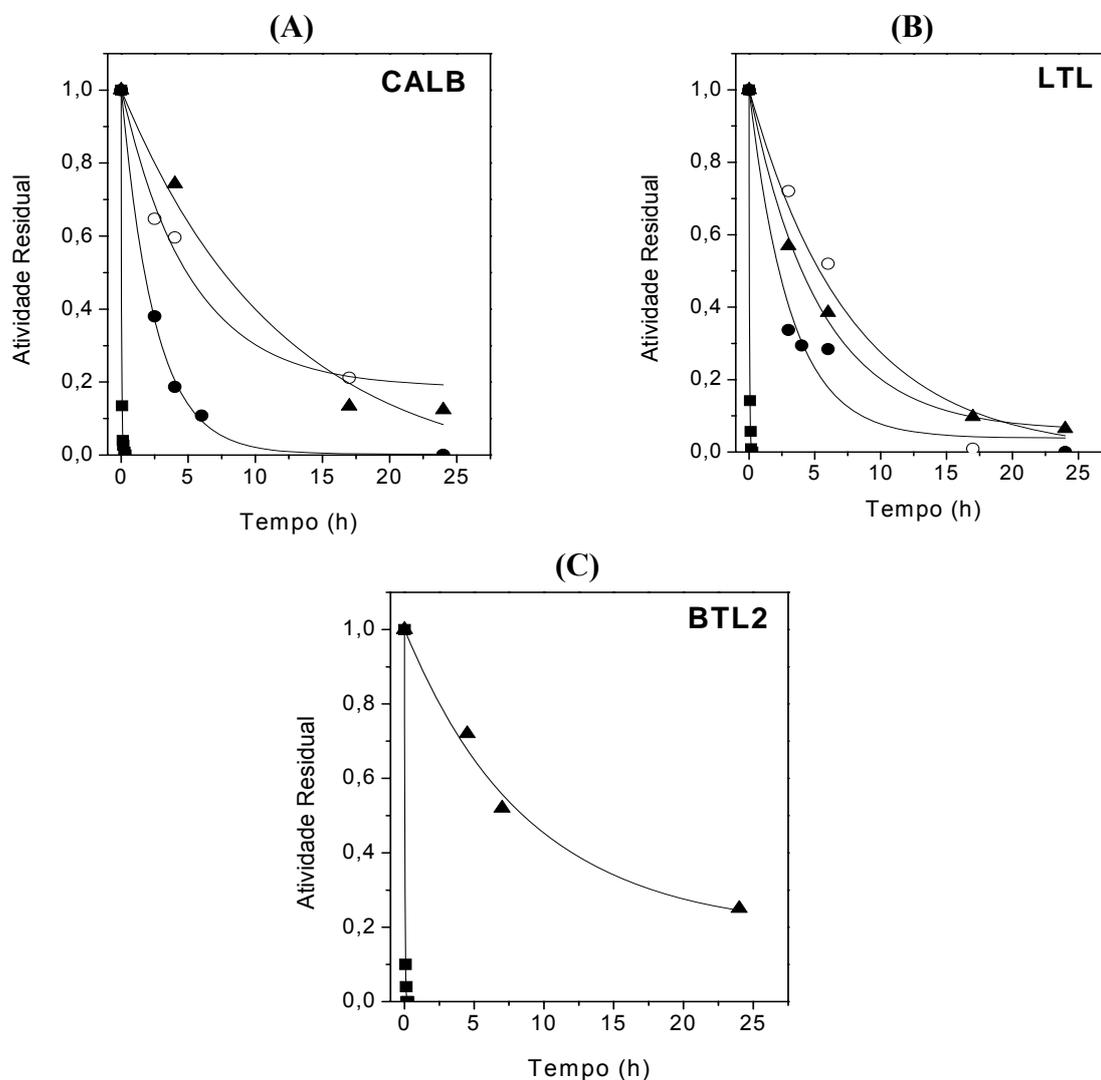


Figura 4.19. Estabilidade térmica de CALB (A), LTL (B) e BTL2 (C) solúvel (■) e imobilizadas em octadecil-sepabeads (●), hexil-toyopearl (○) e octil-agarose (▲) a 70 °C.

Lipases CALB e LTL imobilizadas em octadecil-sepabeads foram os derivados que apresentaram maior velocidade de inativação. CALB imobilizada em octil-agarose e hexil-toyoppearl apresentou semelhante cinética de inativação, mas o derivado de octil-agarose mostrou um pequeno aumento na estabilização em relação ao derivado de hexil-toyoppearl. LTL imobilizada em hexil-toyoperal foi ligeiramente mais estável termicamente que o derivado imobilizado em octil-agarose. A estabilização térmica de LTL em octadecil-sepabeads foi superior à CALB, mostrando realmente que a atividade hidrolítica de CALB foi drasticamente reduzida quando imobilizada neste suporte.

BTL2 imobilizada em octil-agarose foi 339 vezes mais estável que a lipase na forma solúvel, com tempo de meia-vida do derivado de 8,53 h. Este derivado foi o mais estável imobilizado por adsorção física. Lipase CALB imobilizada em octil-agarose foi ligeiramente mais estável que o derivado de hexil-toyoppearl, 196 e 181 vezes mais estável que a enzima solúvel, respectivamente. No entanto, LTL imobilizada em hexil-toyoppearl foi mais estável que o derivado de octil-agarose, 176 e 126 vezes mais estável que as formas livres, respectivamente. CALB e LTL imobilizadas em octadecil-sepabeads foram os derivados com menor estabilização térmica, 62 e 70 vezes mais estáveis que a lipase na forma solúvel, respectivamente. Na Tabela 4.25 são mostrados os tempos de meia-vida das lipases testadas nas formas solúvel e imobilizada. Para as três lipases empregadas neste trabalho, todas apresentaram tempo de meia-vida a 70 °C de aproximadamente 0,03 h e com o processo de imobilização por adsorção física foi possível obter derivados com elevada estabilidade térmica.

Tabela 4.25. Estimativa do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e fator de estabilidade (FE) de lipases nas formas solúvel e imobilizadas em suportes hidrofóbicos.

Lipase (Fonte)	Suporte	$t_{1/2}$ (h)	FE
CALB	solúvel	0,03	-
	octadecil-sepabeads	1,75	62
	octil-agarose	5,55	196
	hexil-toyoppearl	5,13	181
LTL	solúvel	0,03	-
	octadecil-sepabeads	2,05	70
	octil-agarose	3,72	126
	hexil-toyoppearl	5,18	176
BTL2	solúvel	0,03	-
	octil-agarose	8,53	339

Alguns desses derivados foram mais estáveis que os derivados preparados por imobilização covalente, de acordo com dados relatados na literatura (Palomo et al., 2002) e os obtidos neste trabalho, conforme descrito no item 4.1.

4.2.2. Imobilização de Lipases por Adsorção Física em PHB

Na etapa anterior, foram empregados como matrizes para imobilização por adsorção física de lipases suportes disponíveis comercialmente e de alto custo tais como octadecil-sepabeads, hexil-toyopearl e octil-agarose. Como suporte alternativo, foi empregado poli-(hidróxi-butilato), uma matriz altamente hidrofóbica e de baixo custo, ideal para a imobilização de lipases. Foram adquiridas duas configurações de PHB, nas formas de grânulos e em pó. Lipases microbianas disponíveis comercialmente como CALB, LTL, LPF e Lipex[®] 100L e a lipase obtida por fermentação no Laboratório de Controle de Processos (DEQ-UFSCar) BTL2 (*B. thermocatenuatus*) foram imobilizadas em PHB, conforme metodologia descrita por Bastida et al. (1998) e apresentada no item 3.2.8.2. O procedimento de imobilização se baseia na interação hidrofóbica do “*lid*” da enzima com o suporte em baixa força iônica. Foram empregados carregamentos de 5 mg de proteína.g⁻¹ de gel para as lipases disponíveis comercialmente e carregamento de 10 mg.g⁻¹ de suporte para a lipase obtida por fermentação. As propriedades catalíticas dos derivados obtidos estão sumarizadas na Tabela 4.26.

As lipases CALB, LTL e Lipex[®] 100L foram completamente imobilizadas em PHB nas formas em pó e granular. Isto mostra que nestas preparações há somente lipase, ou seja, as condições empregadas na imobilização somente as lipases são imobilizadas e impurezas presentes nas amostras permanecem no sobrenadante final. Esta estratégia de imobilização por adsorção hidrofóbica é muito empregada na literatura para a purificação de preparações de lipases comerciais e obtidas por fermentação em escala laboratorial (Bastida et al., 1998; Palomo et al., 2002; Palomo et al., 2005). Para estas três preparações de lipases verifica-se que a geometria do suporte não influenciou no processo de imobilização. Porém para a lipase LPF a geometria do suporte teve uma forte influência. Aproximadamente 80% da atividade hidrolítica oferecida foi imobilizada em PHB em pó e para o suporte na forma de

grânulos, o rendimento de imobilização foi próximo a 60%. A lipase de *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2), obtida por fermentação, foi completamente imobilizada em PHB, ou seja, após a imobilização não havia atividade hidrolítica no sobrenadante final. Este comportamento não foi verificado para esta mesma lipase imobilizada no suporte granular que apresentou aproximadamente 70% de rendimento de imobilização. Neste caso pode-se notar também a influência da geometria do suporte, similar à lipase LPF.

Tabela 4.26. Parâmetros de imobilização de lipases de diferentes fontes em PHB em pó e granular.

Lipase	PHB	Parâmetros de Imobilização			
		RI (%)	PI (%)	AH _{der.} (U.g ⁻¹ de suporte)	AR (%)
CALB	Pó	100	~100	135,5	25,8
	Granular	100	~100	43,0	10,8
LTL	Pó	100	~100	1558,1	65,4
	Granular	100	~100	200,0	11,1
Lipex [®]	Pó	100	~100	1717,5	82,2
100L	Granular	100	~100	190,2	9,10
LPF	Pó	78,7	77,2	1099,6	80,4
	Granular	59,4	56,2	212,8	22,5
BTL2	Pó	100	73,6	256,6	31,5
	Granular	67,2	50,4	69,6	7,80

RI: Rendimento de imobilização (atividade hidrolítica desaparecida do sobrenadante durante a imobilização) (%); PI: Proteína imobilizada (%); AH_{der.}: Atividade hidrolítica do derivado (U.g⁻¹ de suporte); AR: Atividade recuperada (%)

Para as preparações comerciais CALB, LTL e Lipex[®] 100L aproximadamente toda a proteína oferecida foi completamente imobilizada, mostrando que a concentração de proteínas contaminantes foi desprezível. Os valores de proteína imobilizada de LPF em PHB foram similares aos valores de rendimento de imobilização, mostrando que a pequena diferença entre rendimento de imobilização e proteína imobilizada se deve à presença de contaminantes contidas nesta preparação enzimática, porém em pequena quantidade (Palomo et al., 2004; Palomo et al., 2005). Para a lipase BTL2 imobilizada em PHB em pó, a porcentagem de enzima imobilizada foi em torno de 75% do carregamento oferecido (10

mg.g⁻¹ de suporte). Como no sobrenadante final não havia atividade lipásica, pode-se afirmar que aproximadamente 25% da proteína inicialmente oferecida na imobilização era composta de proteínas contaminantes oriundas do processo de ruptura celular ou de enzimas contaminantes presentes no interior da célula, pois a lipase de BTL2 é uma enzima intracelular. Para a lipase imobilizada em PHB granular, a porcentagem de proteína imobilizada foi próxima a 50%, mostrando a influência da geometria do suporte.

O tamanho de partícula é muito importante para a atividade enzimática, pois a área superficial da matriz está intimamente relacionada com a atividade catalítica da enzima. Os parâmetros de imobilização que obtiveram maior influência da geometria do suporte foram a atividade hidrolítica e, conseqüentemente, a atividade recuperada. As lipases imobilizadas em PHB em pó apresentaram valores de atividades hidrolíticas bastante superiores aos derivados de PHB granular. Os maiores valores de atividade hidrolítica foram obtidos para Lipex[®] 100L (1717,5 U.g⁻¹), LTL (1558,1 U.g⁻¹) e LPF (1099,6 U.g⁻¹) imobilizadas em pó e os valores respectivos de atividade recuperada foram de 82,2, 65,4 e 80,4%. As lipases mais afetadas pela geometria do suporte foram as preparações enzimáticas Lipex[®] 100L, LTL e LPF, com drástica redução da atividade catalítica da enzima de nove, oito e cinco vezes, respectivamente. De acordo com a literatura, a geometria do suporte exerce uma influência bastante significativa sobre a atividade catalítica da enzima visto que suportes com maior área superficial tendem a aumentar o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima. Para as lipases CALB e BTL2, a atividade catalítica dos derivados de PHB em pó foram três a quatro vezes maiores que as dos derivados de PHB granular.

Foi realizada também a síntese do éster butirato de butila para determinar a atividade sintética destes derivados, conforme mostrado na Tabela 4.27. Foi verificada que a conformação do suporte não influenciou no rendimento de esterificação. É importante salientar que a atividade hidrolítica estimada foi realizada empregando azeite de oliva emulsificado e para a atividade de síntese a formação do butirato de butila, substratos muito distintos quanto ao tamanho da cadeia carbônica. Os rendimentos de esterificação foram superiores a 90% para todos os derivados com exceção dos derivados de BTL2 que oscilaram entre 80 a 90%.

Tabela 4.27. Síntese de butirato de butila catalisada por lipases imobilizadas por adsorção física em PHB em pó e granular.

Lipase	PHB	Butirato de Butila (mM)^{24 h}
CALB	Pó	95,0
	Granular	91,5
LTL	Pó	95,0
	Granular	94,6
Lipex[®] 100L	Pó	93,7
	Granular	94,3
LPF	Pó	93,0
	Granular	90,1
BTL2	Pó	89,0
	Granular	82,8

4.3. Seleção dos Derivados Preparados para a Síntese de Biodiesel

Após a imobilização de lipases por diferentes protocolos, os resultados obtidos foram condensados no Quadro 4.1 que apresenta um resumo de todos os derivados obtidos ao longo do trabalho, e respectivas características já determinadas, visando facilitar a análise de resultados e selecionar os derivados preparados com maior atividade catalítica e estabilidade térmica, bem como o custo do biocatalisador. Neste quadro foram apresentados somente os derivados preparados com baixa carga de enzima (1 e 5 mg de proteína.g⁻¹ de gel).

De acordo com o Quadro 4.1, os derivados preparados por imobilização covalente multipontual que apresentaram maior atividade hidrolítica foram obtidos para a LTL imobilizada em glioxil-agarose 6BCL, glioxil-quitosana-alginato-TNBS e epóxi-quitosana-alginato e Lipex[®] 100L imobilizada em glioxil-agarose e em epóxi-quitosana-alginato. Os derivados com maior estabilização foram preparados com BTL2 imobilizada em glioxil-agarose 10 BCL nas formas aminada (FE=3460) e não aminada (FE=2648), seguido de LTL imobilizada em glioxil-agarose 6BCL (FE=~300), CALB imobilizada em glioxil-agarose 10BCL nas formas aminada (FE=289) e não aminada (FE=211), LTL imobilizada em

glioxil-quitosana-alginato-TNBS (FE=45) e LTL imobilizada em glioxil-amino-toyopearl (FE=30). Apesar da elevada atividade hidrolítica dos derivados de Lipex[®] 100 L, os valores de fator de estabilização foram inferiores a 10.

Na imobilização por adsorção física de lipases, os derivados mais estáveis foram preparados por imobilização em octil-agarose e hexil-toyopearl. Entretanto, os derivados com maior atividade hidrolítica foram preparados com a imobilização das lipases em PHB em pó. A utilização desta matriz na imobilização de lipases é atrativa devido ao baixo custo da matriz (US\$ 10,00 o quilo) e hidrofobicidade (ideal para o processo de adsorção física de lipases). Ainda não é reportada na literatura a aplicação de PHB como suporte de imobilização de enzimas.

Após a etapa de imobilização de lipases por diferentes protocolos foi possível selecionar os derivados com maior atividade catalítica em reações de hidrólise e de esterificação e termoestáveis para mediar a síntese de biodiesel por etanolise de óleos vegetais de babaçu e palma. Os derivados preparados de LTL em glioxil-agarose 6BCL, glioxil-amino-toyopearl e glioxil-quitosana-alginato-TNBS foram selecionados por atenderem aos pré-requisitos necessários no que se refere à estabilização de enzimas. Lipase LPF, apesar da baixa atividade hidrolítica e estabilidade térmica também foi utilizada na reação de interesse, pois apresentou elevada atividade catalítica na síntese de butirato de butila e por se tratar de uma lipase bastante empregada em síntese de biodiesel. No Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena, coordenado pela Dra. Heizir Ferreira de Castro esta lipase foi empregada com sucesso na etanolise do óleo de palma (Moreira et al., 2007), apresentando elevada atividade de transesterificação. Outros biocatalisadores selecionados foram aqueles imobilizados por adsorção física em PHB, um suporte de baixo custo e que até o presente momento não foi empregado como matriz na imobilização de enzimas. Os derivados selecionados se encontram destacados em negrito.

Vale ressaltar que até o presente momento, a imobilização de enzimas por ligação covalente multipontual nas matrizes testadas e selecionadas não foram ainda testadas na síntese de biodiesel e este trabalho apresenta resultados inéditos de aplicação de enzimas imobilizadas nestes suportes por ligação covalente multipontual e por adsorção em PHB para a posterior aplicação em síntese de biodiesel.

Apesar de alguns biocatalisadores não terem sido selecionados para a síntese de biodiesel, o Quadro 4.1 pode ser uma importante ferramenta para a seleção de derivados

para outras possíveis aplicações potenciais de lipases como a síntese de ésteres de açúcares, empregados como antitumorais e emulsificantes, resolução de misturas racêmicas na obtenção de intermediários de fármacos e pesticidas, síntese de lipídeos estruturados na obtenção de análogos da gordura do leite materno e enriquecimento com ácidos graxos poli-insaturados em gordura do leite. A síntese destes compostos requer elevada seletividade, como por ex. enantiosseletividade, para a obtenção de compostos de alto valor agregado. Por esta razão, vale ressaltar a importância do quadro resumo de atividades desenvolvidas para outras possíveis aplicações dos biocatalisadores preparados de lipases.

Quadro 4.1. Propriedades catalíticas dos derivados de lipases preparados por diferentes protocolos.

Lipases	Suporte	Protocolo de Ativação	Atividade Hidrolítica (U.g ⁻¹ de gel)	Formação de Butirato de Butila (mM) ^{24h}	Proteína Imobilizada (%)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Estabilidade
Lipase pancreática (LPP)	Agarose 6BCL ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	-	-	-	-	-
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	-	-	-	-	-
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾	-	-	-	-	-
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL)	Agarose 6BCL ^(24h)	Glioxil-GLI⁽¹⁾	319,5^(a)	86,7	26,8	95,4	291
		Glioxil-EPI⁽¹⁾	297,6^(a)	85,5	25,0	96,0	276
		Glioxil-amino-GLU⁽¹⁾	117,0^(a)	57,3	100	10,2	206
	Agarose 6BCL ^(48h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	290,8 ^(a)	NR	26,4	87,7	329
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	279,5 ^(a)	NR	25,0	89,0	295
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾	129,3 ^(a)	NR	100	10,3	221
	Agarose 6BCL ^(72h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	271,3 ^(a)	NR	27,0	81,8	277
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	279,2 ^(a)	NR	26,4	81,5	271
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾	105,8 ^(a)	NR	100	8,42	208
	Quitosana ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	109,1 ^(a)	NR	28,4	40,0	15,2
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	97,6 ^(a)	NR	24,0	42,5	12,5
		GLU ⁽¹⁾	95,3 ^(a)	NR	60,0	13,1	7,10
	Quitosana-TNBS ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	108,9 ^(a)	NR	17,4	65,5	13,9
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	97,6 ^(a)	NR	19,6	47,1	17,7
		GLU ⁽¹⁾	90,8 ^(a)	NR	39,6	16,0	8,75

Quadro 4.1. Propriedades catalíticas dos derivados de lipases preparados por diferentes protocolos (continuação).

Lipases	Suporte	Protocolo de Ativação	Atividade Hidrolítica (U.g ⁻¹ de gel)	Formação de Butirato de Butila (mM) ^{24h}	Proteína Imobilizada (%)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Estabilidade
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL)	Quitosana-Gelatina ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	99,9 ^(a)	NR	21,6	48,5	12,5
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	99,9 ^(a)	NR	26,2	40,0	11,2
		GLU ⁽¹⁾	95,3 ^(a)	NR	61,0	16,3	8,62
	Quitosana-Gelatina-TNBS ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	118,1 ^(a)	NR	23,6	52,4	23,5
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	121,6 ^(a)	NR	23,2	74,2	27,3
		GLU ⁽¹⁾	113,6 ^(a)	NR	64,0	16,4	11,0
	Quitosana-Carragenina ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	74,0 ^(a)	NR	19,0	25,1	7,45
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	50,0 ^(a)	NR	21,6	16,1	5,24
		GLU ⁽¹⁾	36,3 ^(a)	NR	39,6	5,80	2,31
	Quitosana-Carragenina-TNBS ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	104,4 ^(a)	NR	21,2	38,7	9,44
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	140,7 ^(a)	NR	24,4	50,2	16,5
		GLU ⁽¹⁾	95,7 ^(a)	NR	37,4	14,3	10,6
	Quitosana-PVA ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	131,5 ^(a)	NR	28,8	44,6	14,3
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	115,1 ^(a)	NR	31,0	38,9	14,6
		GLU ⁽¹⁾	104,1 ^(a)	NR	57,6	15,3	12,3
	Quitosana-PVA-TNBS ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	160,5 ^(a)	NR	27,2	51,3	30,1
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	178,7 ^(a)	NR	27,8	54,9	31,4
		GLU ⁽¹⁾	148,9 ^(a)	NR	54,4	23,1	22,1

Quadro 4.1. Propriedades catalíticas dos derivados de lipases preparados por diferentes protocolos (continuação).

Lipases	Suporte	Protocolo de Ativação	Atividade Hidrolítica (U.g ⁻¹ de gel)	Formação de Butirato de Butila (mM) ^{24 h}	Proteína Imobilizada (%)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Estabilidade
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL)	Quitosana-Alginato ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	163,5 ^(a)	NR	36,4	51,4	7,89
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	201,7 ^(a)	NR	34,0	58,9	12,3
		GLU ⁽¹⁾	194,9 ^(a)	NR	59,4	28,3	9,29
	Quitosana-Alginato-TNBS^(12h)	Glioxil-GLI⁽¹⁾	234,6^(a)	57,4	14,4	67,8	45,3
		Glioxil-EPI⁽¹⁾	217,0^(a)	55,8	22,2	61,7	45,2
		GLU⁽¹⁾	213,7^(a)	42,9	70,8	31,7	44,2
	Quitosana-Alginato-TNBS ^(24h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	147,9 ^(a)	NR	34,8	47,7	43,3
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	126,0 ^(a)	NR	34,6	44,5	48,7
		GLU ⁽¹⁾	164,4 ^(a)	NR	73,8	29,2	42,2
	Quitosana-Alginato-LAU ^(12h)	Glioxil-GLI (LAU-1%) ⁽¹⁾	54,8 ^(a)	NR	21,2	22,7	18,0
		Glioxil-GLI (LAU-3%) ⁽¹⁾	71,2 ^(a)	NR	23,6	29,1	24,2
		Glioxil-GLI (LAU-5%) ⁽¹⁾	87,7 ^(a)	NR	27,2	36,4	24,5
	Quitosana-Alginato-levedura-TNBS ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	109,6 ^(a)	NR	21,7	37,2	37,8
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	158,9 ^(a)	NR	22,3	48,2	48,8
		GLU ⁽¹⁾	148,0 ^(a)	NR	51,1	42,1	46,1
	Amino-Toyopearl ^(24h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	188,4 ^(a)	66,6	32,4	60,9	27,0
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	244,9 ^(a)	60,0	36,8	69,7	31,0
		Glioxil-amino- GLU ⁽¹⁾	169,6 ^(a)	46,2	100	18,0	21,0

Quadro 4.1. Propriedades catalíticas dos derivados de lipases preparados por diferentes protocolos (continuação).

Lipases	Suporte	Protocolo de Ativação	Atividade Hidrolítica (U.g ⁻¹ de gel)	Formação de Butirato de Butila (mM) ^{24 h}	Proteína Imobilizada (%)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Estabilidade
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL)	PHB ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	76,7 ^(a)	NR	20,0	40,7	22,5
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	-	-	-	-	-
		Glioxil-amino- GLU ⁽¹⁾	76,8 ^(a)	NR	34,8	23,1	16,2
	Bagaço de cana-de-açúcar ^(12h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	183,6 ^(a)	NR	25,4	75,5	17,7
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	191,8 ^(a)	NR	25,4	78,8	19,1
		Glioxil-amino- GLU ⁽¹⁾	79,5 ^(a)	NR	39,8	21,1	13,2
	Quitossana-Alginato ^(24h)	Epóxi ⁽¹⁾	305,8 ^(a)	24,3	52,0	61,9	6,0
		Epóxi-tiol ⁽¹⁾	175,1 ^(a)	27,5	44,0	41,7	3,4
	Octil-agarose ^(1h)	Adsorção física ⁽²⁾	2475,0 ^(b)	NR	100	4500	126,0
	Hexil-toyopearl ^(1h)	Adsorção física ⁽²⁾	880,0 ^(b)	NR	100	1600	176,0
	Octadecil-sepabeads ^(1h)	Adsorção física ⁽²⁾	32,5 ^(b)	NR	100	51,0	70,0
		PHB em pó^(12h)	Adsorção física⁽¹⁾	1558,1^(a)	95,0	~100	65,4
	PHB granular^(18h)	Adsorção física⁽¹⁾	200,0^(a)	91,5	~100	11,1	NR
<i>Bacillus thermocatenulatus</i> (BTL2)	Octil-agarose ^(1h)	Adsorção física ⁽¹⁾	NR	NR	NR	NR	340
	Agarose 10BCL^(24 h)	Glioxil-GLI⁽²⁾	NR	NR	87	14,0	2648
		Glioxil-GLI (lipase aminada)⁽²⁾	NR	NR	100	22,0	4360
	PHB em pó^(12h)	Adsorção física⁽¹⁾	256,6^(a)	89,0	73,6	31,5	NR
	PHB granular^(18h)	Adsorção física⁽¹⁾	69,6^(a)	82,8	50,4	7,80	NR

Quadro 4.1. Propriedades catalíticas dos derivados de lipases preparados por diferentes protocolos (continuação).

Lipases	Suporte	Protocolo de Ativação	Atividade Hidrolítica (U.g ⁻¹ de gel)	Formação de Butirato de Butila (mM) ^{24 h}	Proteína Imobilizada (%)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Estabilidade	
<i>Candida antarctica</i>	Octil-agarose ^(1h)	Adsorção física ⁽²⁾	231,0 ^(b)	NR	100	77,0	196,0	
B (CALB)	Hexil-toyopearl ^(1h)	Adsorção física ⁽²⁾	243,0 ^(b)	NR	100	81,0	181,0	
	Octadecil-sepabeads ^(1h)	Adsorção física ⁽²⁾	111,0 ^(b)	NR	100	37,0	62,0	
	PHB em pó^(12h)	Adsorção física⁽¹⁾	135,5^(a)	95,0	~100	25,8	NR	
	PHB granular^(18h)	Adsorção física⁽¹⁾	43,0^(a)	91,5	~100	10,8	NR	
	Epóxi-Sepabeads ^(24h)	Glioxil (CALB não aminada)		38,1 ^(b)	NR	100	15,0	13,0
		Glioxil (lipase aminada)		33,0 ^(b)	NR	100	13,0	21,0
	Agarose 6BCL ^(24h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾		64,7 ^(a)	NR	40,6	40,0	23,0
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾		58,8 ^(a)	NR	43,0	34,4	18,0
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾		35,3 ^(a)	NR	100	8,90	15,0
	Agarose 6BCL ^(48h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾		52,9 ^(a)	NR	45,4	30,0	21,4
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾		52,9 ^(a)	NR	41,0	22,5	20,0
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾		35,3 ^(a)	NR	100	8,90	17,0
	Agarose 6BCL ^(72h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾		41,2 ^(a)	NR	43,4	23,8	22,0
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾		41,8 ^(a)	NR	45,6	19,0	22,5
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾		29,4 ^(a)	NR	100	7,40	20,0
	Agarose 10BCL^(24h)	Glioxil (lipase não aminada⁽¹⁾)		143,4^(b)	NR	77,0	56,0	211,0
		Glioxil (lipase aminada)		155,0^(b)	NR	88,0	61,0	287,0

Quadro 4.1. Propriedades catalíticas dos derivados de lipases preparados por diferentes protocolos (continuação).

Lipases	Suporte	Protocolo de Ativação	Atividade Hidrolítica (U.g ⁻¹ de gel)	Formação de Butirato de Butila (mM) ^{24 h}	Proteína Imobilizada (%)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Estabilidade
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LPF)	Agarose 6BCL ^(24h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	66,0 ^(a)	NR	70,6	8,60	7,80
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	59,0 ^(a)	NR	65,0	8,30	7,40
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾	40,0 ^(a)	NR	100	5,20	6,80
	Agarose 6BCL ^(48h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	64,6 ^(a)	NR	66,8	6,33	7,40
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	58,8 ^(a)	NR	60,0	6,43	8,70
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾	40,0 ^(a)	NR	100	5,20	6,50
	Agarose 6BCL ^(72h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	58,8 ^(a)	NR	68,0	5,70	6,90
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	52,9 ^(a)	NR	63,0	5,51	8,40
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾	42,4 ^(a)	NR	100	5,60	7,00
	Amino-Toyopearl ^(24h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	44,0 ^(a)	62,2	37,8	10,7	5,20
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	58,7 ^(a)	65,5	44,0	12,3	5,70
	Quitosana-Alginato ^(24h)	Epóxi (monofuncional) ⁽¹⁾	150,7 ^(a)	27,4	62,8	15,2	2,2
	PHB em pó^(12h)	Adsorção física⁽¹⁾	1099,6^(a)	93,0	77,2	73,1	NR
PHB granular^(18h)	Adsorção física⁽¹⁾	212,8^(a)	90,1	56,2	22,5	NR	
Lipex [®] 100L	Agarose 6BCL ^(24h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	253,0 ^(a)	NR	96,8	16,4	6,10
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	244,0 ^(a)	NR	90,0	17,0	6,50
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾	92,0 ^(a)	NR	100	5,80	4,70

Quadro 4.1. Propriedades catalíticas dos derivados de lipases preparados por diferentes protocolos (continuação).

Lipases	Suporte	Protocolo de Ativação	Atividade Hidrolítica (U.g ⁻¹ de gel)	Formação de Butirato de Butila (mM) ^{24 h}	Proteína Imobilizada (%)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Estabilidade	
Lipex [®] 100L	Agarose 6BCL ^(48h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	235,2 ^(a)	NR	95,6	15,5	6,70	
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	231,1 ^(a)	NR	88,8	15,7	6,40	
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾	75,0 ^(a)	NR	100	4,71	4,20	
	Agarose 6BCL ^(72h)	Glioxil-GLI ⁽¹⁾	211,7 ^(a)	NR	96,0	13,9	7,50	
		Glioxil-EPI ⁽¹⁾	217,0 ^(a)	NR	88,4	14,6	9,00	
		Glioxil-amino-GLU ⁽¹⁾	77,5 ^(a)	NR	100	4,30	4,00	
	Quitosana-Alginato ^(24h)	Epóxi (monofuncional) ⁽¹⁾	235,2 ^(a)	34,1	42,0	63,8	6,0	
		PHB em pó^(12h)	Adsorção física⁽¹⁾	1715,5^(a)	93,7	~100	82,2	NR
		PHB granular^(18h)	Adsorção física⁽¹⁾	190,2^(a)	94,3	~100	9,10	NR

GLI: glicidol; EPI: epícloridrina; GLU: glutaraldeído; Rendimento de imobilização: Atividade hidrolítica teoricamente imobilizada; $t_{1/2}$: tempo de meia-vida das lipases solúveis a 70 °C; Fator de Estabilidade: relação entre o tempo de meia-vida do derivado e da lipase solúvel; PHB: poli-hidróxibutirato; (1) e (2): imobilização das lipases com carregamento de 5 e de 1 mg proteína.g⁻¹ de gel, respectivamente NR: não realizado; TNBS: ácido 2,4,6 trinitrobenzenossulfônico; (a) hidrólise do azeite de oliva emulsificado; (b) hidrólise do *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB).

4.4. Etanólise de Óleos Vegetais Catalisada por Derivados de Lipases Seleccionados

4.4.1. Síntese de Biodiesel Catalisadas por Lipases LTL e LPF Imobilizadas em Matrizes Comerciais Agarose e Amino-Toyopearl

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi imobilizada em géis glioxil-agarose 6BCL e os derivados obtidos apresentaram maior fator de estabilidade. Esta lipase também foi imobilizada em glioxil-toyopearl e a estabilização foi entre 27 a 31 vezes mais estável que a enzima solúvel. Por este motivo foram adotados estes derivados que permitiram imobilizar LTL por ligação covalente multipontual para a síntese de biodiesel, empregando os óleos vegetais babaçu e palma, e etanol como doador de grupo acila. No Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena a preparação de lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) tem sido extensivamente empregada em reações de biotransformações (Moreira et al., 2007, Da Rós, 2009). A imobilização de LPF em géis de agarose previamente ativado foi realizada, porém não foi possível estabilizá-la termicamente. Para efeitos comparativos, foi empregada esta lipase para a síntese de biodiesel com os dois tipos de óleos. As condições reacionais empregadas para a síntese de biodiesel foram baseadas em estudos realizados no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP (Moreira et al., 2007; Da Rós, 2009). Na síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu foi empregada a relação molar óleo:etanol de 1:9 (Da Rós, 2009) e para o óleo de palma a relação molar foi de 1:18 (Moreira et al., 2007). A temperatura de síntese foi de 45 °C, empregando 2 mg de proteína imobilizada.g⁻¹ de óleo vegetal. Os derivados ativados por glutaraldeído não foram empregados nestes testes, somente aqueles obtidos por ativação glioxil (glicidol e epícloridrina). Os testes de síntese de biodiesel foram realizados em meios isentos de solventes orgânicos e a miscibilidade entre óleo e etanol foi auxiliada pela agitação do meio reacional (200 rpm em incubadora rotativa).

Os resultados de conversão do óleo de palma em mono-ésteres de etila catalisada por lipases LPF e LTL estão sumarizados na Tabela 4.28.

Em 24 h, os valores de rendimento de óleo de palma em ésteres etílicos variaram entre 85,2 e 100% e em 48 h o valor mínimo de conversão foi superior a 93%. Os derivados de LPF preparados por imobilização em glioxil-agarose ativado por glicidol e

glioxil-toyopearl ativado por epiclorigidrina e o derivado de LTL imobilizado em glioxil-toyopearl ativado por glicidol apresentaram máximo rendimento em 24 h. Ao final de 48 h, apenas LTL imobilizada em glioxil-agarose ativado por glicidol e em glioxil-toyopearl ativado por epiclorigidrina não atingiram rendimento máximo. Não foi verificada influência significativa do tipo de enzima, agente de ativação e tipo de suporte para a síntese de biodiesel a partir do óleo de palma. Estes valores de rendimento estão de acordo com dados relatados na literatura (Moreira et al., 2007).

Tabela 4.28. Rendimento de transesterificação de óleo de palma e etanol por lipases microbianas de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) imobilizadas covalentemente em géis glioxil-agarose e glioxil-toyopearl ativados por diferentes protocolos.

Suportes	Lipase	Agente de Ativação	Rendimento (%)	
			24 h	48 h
Toyopearl	LTL	GLI	100	100
Toyopearl	LTL	EPI	95,5	97,3
Toyopearl	LPF	GLI	95,3	100
Toyopearl	LPF	EPI	100	100
Agarose	LTL	GLI	85,2	93,5
Agarose	LTL	EPI	90,7	100
Agarose	LPF	GLI	100	100
Agarose	LPF	EPI	93,1	100

Na síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu o rendimento foi inferior aos resultados obtidos para o óleo de palma (Tabela 4.29). Em 24 h, os valores de rendimento de óleo de babaçu em biodiesel variaram entre 63,6 a 84,7% e em 48 h o valor mínimo de rendimento foi superior a 82%. Nenhum derivado converteu 100% do óleo de babaçu em biodiesel ao final de 48 h.

Estes valores de rendimento foram inferiores ao óleo de palma devido à especificidade das duas lipases testadas por ácidos graxos de cadeia longa presentes no óleo de palma. Os principais ácidos graxos presentes no óleo de palma são os ácidos palmítico - C_{16:0} (46,8 %) e oleico - C_{18:1} (37,6 %) (Moreira et al., 2007). No óleo de babaçu os principais ácidos presentes são láurico - C_{12:0} (44,7%), mirístico - C_{14:0} (17,5 %) e oleico (15,2 %)

(Urioste et al., 2008). De acordo com os resultados, as lipases LPF e LTL possuem maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa como ácidos palmítico e oleico e a composição do óleo de babaçu é predominantemente de ácidos graxos de cadeia curta e média. Neste contexto, as lipases testadas catalisaram preferencialmente a transesterificação do óleo com maior concentração de ácidos graxos de cadeia longa (óleo de palma). A transesterificação dos óleos de babaçu e palma empregando etanol como doador de grupo acila foi catalisada por lipases LPF e de *Pseudomonas cepacia* (LPC) assistidas por microondas (Da Rós, 2009). A lipase LPF apresentou maior atividade de transesterificação para o óleo de palma, mostrando que os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com a literatura.

Tabela 4.29. Rendimento de transesterificação de óleo de babaçu e etanol por lipases microbianas de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) imobilizadas covalentemente em géis glioxil-agarose e glioxil-toyopearl ativados por diferentes protocolos.

Suportes	Lipase	Agente de Ativação	Rendimento (%)	
			24 h	48 h
Toyopearl	LTL	GLI	74,5	82,2
Toyopearl	LTL	EPI	73,8	84,0
Toyopearl	LPF	GLI	84,0	88,6
Toyopearl	LPF	EPI	68,9	83,8
Agarose	LTL	GLI	63,6	89,0
Agarose	LTL	EPI	81,5	91,9
Agarose	LPF	GLI	84,7	93,2
Agarose	LPF	EPI	78,0	94,9

Os valores de viscosidade cinemática obtidos para o biodiesel do óleo de palma após 48 h de reação foram próximos de 4,30 cSt e o biodiesel de óleo de babaçu foi inferior a 3,40 cSt e de acordo com as especificações recomendadas pela ANP, os mono-ésteres de etila (biodiesel) obtidos na transesterificação dos óleos testados podem ser utilizados em motores de ciclo a diesel sem nenhuma adaptação, pois a faixa de viscosidade apropriada para a utilização de biodiesel como combustível é de 3 a 6 cSt.

4.4.2. Síntese de Biodiesel Catalisada por LTL Imobilizada em Polieletrólito Quitosana-Alginato Hidrofobizado por TNBS

Foi feita uma triagem de suportes para a estabilização da lipase LTL empregando hidrogel de quitosana e complexos polieletrólíticos empregando como agente de hidrofobização ácido 2,4,6 trinitrobenzenossulfônico (TNBS). O complexo polieletrólítico quitosana-alginato hidrofobizado por TNBS ativado por glicidol, epicloridrina e glutaraldeído permitiu obter um microambiente favorável à imobilização da enzima, pois foi possível obter derivados termoestáveis (FE=45) e com alta atividade catalítica. Derivados de LTL imobilizados neste suporte só foram menos estáveis que os derivados de LTL imobilizados em glioxil-agarose (Tabela 4.8).

Estes derivados foram empregados na síntese de biodiesel a partir da etanólise do óleo de palma empregando razão molar óleo:etanol de 1:18 e carregamento de 2 mg de proteína imobilizada.g⁻¹ de óleo. Os perfis de síntese de biodiesel empregando LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativado por diferentes protocolos são mostrados na Figura 4.20.

Os perfis de síntese de biodiesel por LTL imobilizada em glioxil-quitosana-alginato-TNBS foram bastante similares para a enzima imobilizada em gel glioxil (glicidol e epicloridrina) como pode ser visto na Figura 4.20. Em 14 h de reação, aproximadamente 70% do óleo foi convertido em mono-ésteres de etila e para o derivado obtido por ativação com glutaraldeído, o rendimento foi próximo a 50%. Em 24 h, o rendimento da reação catalisada pelos derivados glioxil foi próximo a 90% e para o derivado ativado por glutaraldeído foi de 70%, o mesmo valor obtido para os outros derivados em 14 h. Ao final de 48 h, o rendimento em mono-ésteres de etila foi de 100% para os derivados glioxil, o que não foi verificado para LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS-glutaraldeído (85,5%). Estes valores são similares aos resultados obtidos na síntese de butirato de butila, na qual os derivados glioxil foram mais ativos em meio orgânico.

De acordo com a Figura 4.20, em 14 h de reação a viscosidade dos mono-ésteres de etila produzidos atingiu a faixa ótima de aplicação como combustível de acordo com especificações recomendadas pela Agência Brasileira de Petróleo (ANP) para ser usado como biocombustível, com viscosidade final de aproximadamente 4,30 cSt.

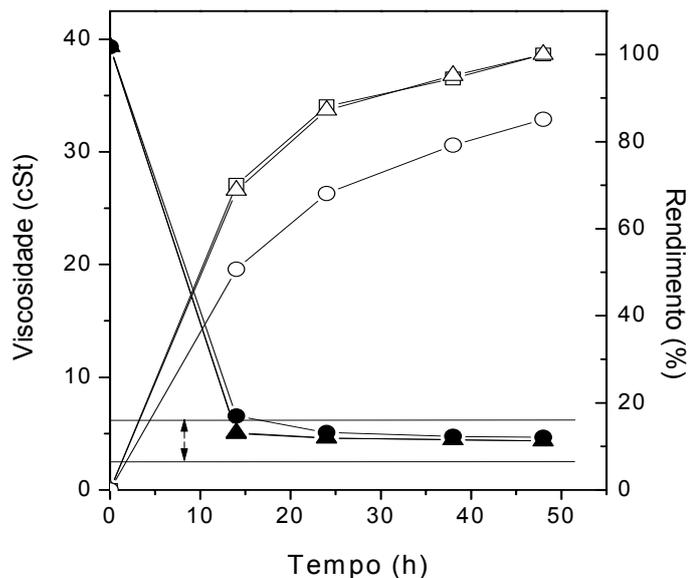


Figura 4.20. Rendimento de transesterificação do óleo de palma em biodiesel (símbolos vazios) e redução da viscosidade (símbolos cheios) por etanólise do óleo de babaçu catalisada por LTL imobilizada em quitosana-alginato-TNBS ativada por glicidol (quadrado), epicloridrina (triângulo) e glutaraldeído (círculo).

4.4.3. Síntese de Biodiesel Catalisada por Lipases Microbianas Imobilizadas em Diferentes Configurações de PHB

Lipases CALB, LTL, LPF, BTL2 e Lipex[®] 100L foram imobilizadas por adsorção hidrofóbica em PHB em pó e granular e empregadas na síntese de biodiesel por etanólise do óleo de babaçu. A concentração de enzima empregada foi de 10% em massa de derivado em relação à massa total dos reagentes de partida (óleo + etanol). Os perfis de conversão de óleo de babaçu em monoésteres de etila (biodiesel) são mostrados na Figura 4.21.

Os perfis de rendimento de transesterificação para as preparações de lipases CALB, LTL e Lipex[®] 100L imobilizadas em PHB em pó e granular foram bastante similares. A influência da configuração do suporte na atividade hidrolítica foi significativa, mas na síntese de biodiesel este comportamento não foi observado. Possivelmente, a viscosidade do substrato empregado na reação de hidrólise (azeite de oliva emulsificado com goma arábica) é maior que a viscosidade do substrato empregado na síntese de biodiesel e alguns fatores

contribuem para uma possível redução dessa viscosidade como o excesso de etanol empregado e a temperatura de reação (45 °C), contribuindo para uma maior difusividade do substrato empregado na síntese de biodiesel ao microambiente da enzima imobilizada.

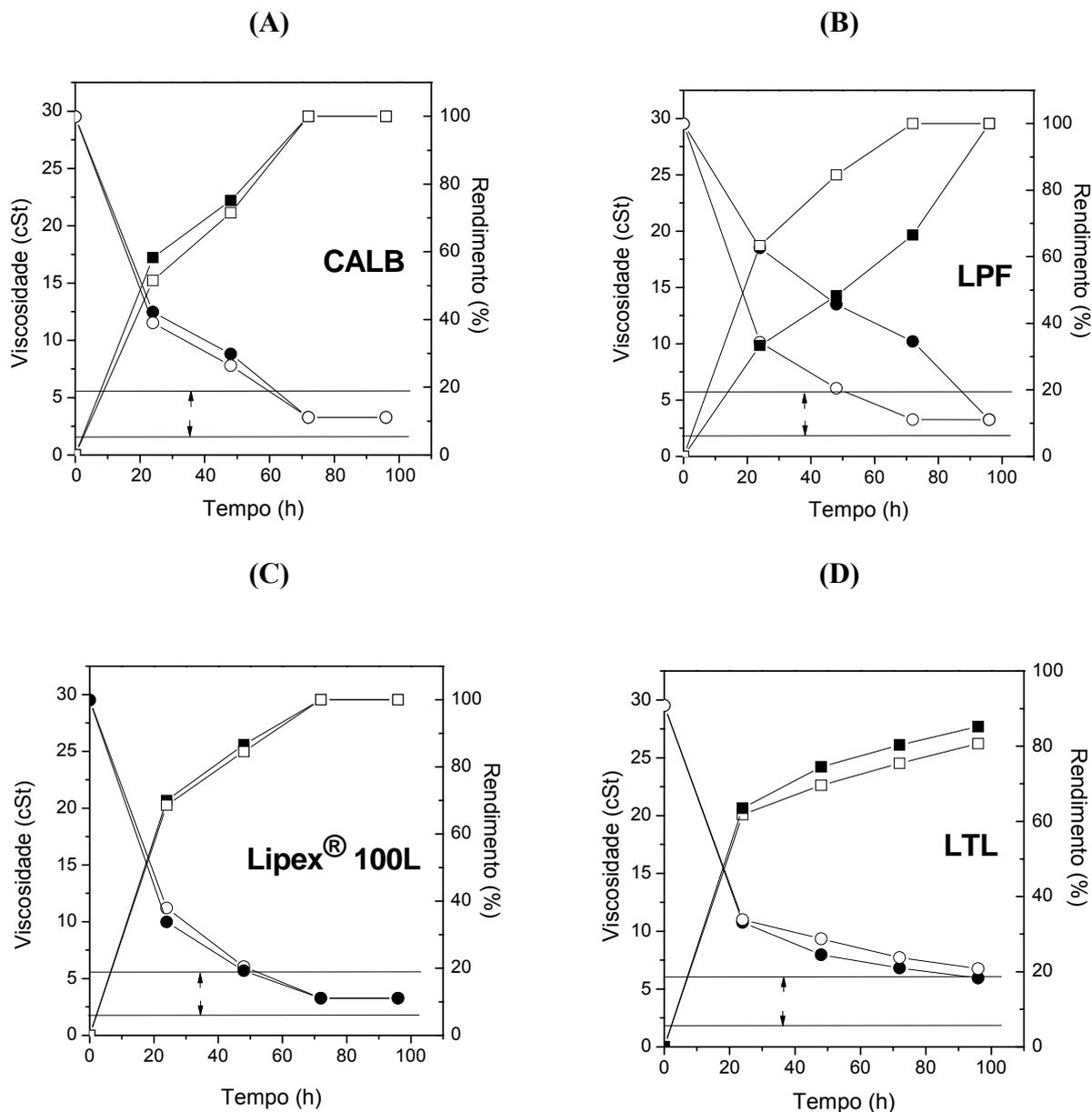


Figura 4.21. Rendimento de transesterificação (quadrados) e redução da viscosidade (círculos) por etanolise do óleo de babaçu catalisada por lipases (A) CALB, (B) LPF, (C) Lipex[®] 100L e (D) LTL imobilizadas por adsorção hidrofóbica em PHB em pó (cheio) e granular (vazio).

Em 24 h, a lipase CALB converteu 50,0% do substrato em biodiesel, inferior à lipase Lipex[®] 100L que converteu aproximadamente 63,0%. Em 48 h, é observado o mesmo

comportamento, pois a lipase CALB havia convertido 75,0% em biodiesel e a lipase Lipex[®] 100L 86,0%. O rendimento máximo obtido para estas lipases foi em 72 h. Para a lipase LPF, a geometria do suporte influenciou a síntese de biodiesel. Em 24 e 48 h de reação, a conversão obtida para a lipase imobilizada em PHB granular foi duas vezes superior ao derivado em pó. O rendimento máximo obtido para o derivado preparado em PHB granular foi em 72 h, 24 h a menos que o derivado em pó.

Os valores de viscosidade para o biodiesel sintetizado a partir de lipases imobilizadas em PHB também atingiram as especificações da ANP. De acordo com a Figura 4.21, os valores de viscosidade só atenderam as especificações após 72 h de reação, com viscosidade em torno de 3,4 cSt. Para a lipase LTL, o derivado preparado em PHB em pó apresentou viscosidade do biodiesel final foi de 5,95 cSt e para o derivado preparado em PHB granular foi de 6,76 cSt, fora das especificações para ser utilizado como combustível, pois a faixa limite é de 3 a 6 cSt.

Dentre as lipases testadas, apenas BTL2 apresentou baixa especificidade pelo substrato. A conversão obtida ao final de 96 h foi próxima a 2%. Acreditava-se, inicialmente, que esta enzima mostrasse um desempenho similar às outras lipases, pois na reação de síntese de butirato de butila esta lipase mostrou ser bastante ativa.

A concentração de lipase imobilizada oferecida para cada meio reacional, bem como os valores de rendimento máximo e produtividade em 24 h de reação são mostrados na Tabela 4.30. As concentrações de lipases oferecidas de CALB, LTL, Lipex[®] 100L e BTL2 imobilizada em PHB granular foram de 0,79 mg.g⁻¹ de óleo, pois estes derivados apresentaram a mesma concentração de enzima imobilizada. BTL2 imobilizada em PHB em pó foi o sistema com maior concentração de lipase oferecida (1,17 mg.g⁻¹ de óleo). Embora, para a LPF imobilizada em PHB granular, a relação proteína/óleo tenha sido a menor testada entre os derivados de lipases preparados em PHB (0,45 mg.g⁻¹ de óleo), o rendimento de transesterificação foi similar aos outros derivados como CALB e Lipex[®] 100L. LPF imobilizada em PHB em pó, mesmo com maior concentração de proteína oferecida, converteu totalmente o óleo de babaçu em biodiesel após 96 h de reação. O rendimento máximo obtido para LTL, entre 80 e 85%, foi alcançado após 96 h de reação. BTL2 não transesterificou o óleo de babaçu e etanol.

Tabela 4.30. Proteína imobilizada oferecida na etanólise do óleo de babaçu e produtividade.

Lipases	PHB	PI _{oferecida} .g ⁻¹ de óleo	Rendimento máximo/tempo (h)	Produtividade (mg _{biodiesel} .h ⁻¹ . mg _{PI} ⁻¹) ^{24 h}
CALB	Pó	0,79	100%/72h	21,4
	granular	0,79	100%/72h	18,9
LTL	Pó	0,79	80,7%/96h	22,8
	granular	0,79	85,2%/96h	23,4
Lipex [®] 100L	Pó	0,79	100%/72h	25,7
	granular	0,79	100%/72h	25,1
LPF	Pó	0,61	100%/96h	15,8
	granular	0,45	100%/72h	40,9
BTL2	Pó	1,17	0	0
	granular	0,79	0	0

PI_{oferecida}: proteína imobilizada oferecida (mg) na transesterificação por grama de óleo.

Apesar da menor concentração de lipase oferecida na etanólise de óleo de babaçu, o derivado de LPF preparado por adsorção física em PHB apresentou maior produtividade em 24 h (40,9 mg_{biodiesel}.h⁻¹. mg_{PI}⁻¹), quase três vezes maior que a mesma enzima imobilizada no suporte em pó. Uma possível explicação para este fato é a sua massa molecular ser superior às outras enzimas testadas e com a imobilização em suporte com maior área superficial (PHB em pó) o número de moléculas de enzimas imobilizadas também é maior e limitações difusionais podem ocorrer. Outra hipótese para o menor desempenho de LPF imobilizada em PHB em pó é que a enzima pode ter sofrido maior efeito de inibição pelo etanol e/ou glicerol produzido devido ao acúmulo destes compostos no microambiente da enzima quando imobilizada em matriz com menor diâmetro de poro. Para os outros derivados preparados de lipases não foi verificada influência significativa da geometria do suporte sobre a conversão do óleo de babaçu em biodiesel, o que não foi constatado para a LPF.

Na literatura são reportados estudos conduzidos com diferentes lipases imobilizadas por adsorção física em polipropileno macroporoso na síntese de biodiesel a partir da metanólise de óleos de vegetais (Salis et al., 2008). Os autores testaram oito preparações de lipases microbinas de *Mucor javanicus* (Lipase M), *Penicillium camembertii* (Lipase G), *Rhizopus oryzae* (Lipase F), *Candida rugosa* (Lipase AY), *Penicillium roquefortii*

(Lipase R), *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), *Pseudomonas cepacia* (Lipase PS) e de *Aspergillus niger* (Lipase A) fornecidas pela empresa Amano Enzymes e o máximo rendimento de transesterificação foi alcançado para a reação catalisada por lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF), comportamento semelhante ao obtido no presente trabalho.

BTL2 imobilizada em PHB não converteu o óleo de babaçu em mono-ésteres de etila. Algumas lipases imobilizadas por adsorção física em suportes hidrofóbicos, oferecendo baixo carregamento de enzima, são inativadas devido à forte interação entre a enzima e o suporte (Bosley e Peilow, 1997; Salis et al., 2003). Em reações de hidrólise e esterificação, os derivados de BTL2 apresentaram atividade catalítica e por esta razão a hipótese de que a enzima sofreu inativação durante a imobilização foi descartada. Lipase BTL2 imobilizada em PHB apresentou elevada atividade catalítica em meio orgânico na síntese de butirato de butila (Tabela 4.27) e por esta razão ela foi empregada na esterificação dos ácidos butírico ($C_{4:0}$), láurico ($C_{12:0}$) e oleico ($C_{18:1}$) com etanol e butanol em diferentes razões molares e os valores de conversão obtidos estão sumarizados na Figura 4.22.

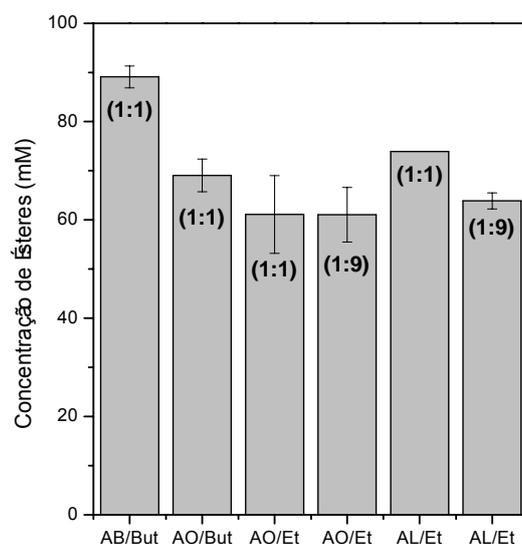


Figura 4.22. Síntese de ésteres catalisadas por BTL2 imobilizada em PHB em pó.

A maior conversão em éster foi verificada na esterificação ácido butírico ($C_{4:0}$) e butanol (AB/But), como mostrado anteriormente, convertendo aproximadamente 90% dos materiais de partida em butirato de butila. Na esterificação do ácido oleico (AO) com butanol

(AO/But), a conversão foi ao redor de 70%. Substituindo o butanol por etanol, a concentração de oleato de etila obtida foi de 60 mM e em excesso de etanol (1:9) a concentração de éster foi a mesma que a reação conduzida em concentrações equimolares (1:1), não havendo influência da concentração de etanol sobre a síntese de oleato de etila. A substituição do butanol por etanol na esterificação com ácido oleico reduziu ligeiramente a atividade enzimática do biocatalisador. Na esterificação do ácido láurico com etanol (AL/Et), a reação equimolar (1:1) mostrou maior conversão em laurato de etila.

De acordo com os resultados, a enzima mostrou maior atividade catalítica na esterificação de ácido carboxílico de cadeia curta ($C_{4:0}$) com butanol e na esterificação de ácidos graxos de cadeia média ($C_{12:0}$) e longa ($C_{18:1}$) a conversão foi ligeiramente inferior, mostrando maior afinidade por ácidos de cadeia curta. O tipo de álcool e razão molar na esterificação de ácidos graxos de cadeia média e longa não apresentou influência significativa sobre a atividade catalítica da enzima.

Esta preparação de lipase não catalisou eficientemente a transesterificação de óleo de babaçu com etanol, mas mostrou ser ativa na esterificação de ácidos de cadeia curta e longa com alcoóis de cadeia curta, e de acordo com os resultados mostrados a lipase BTL2 mostrou ser altamente seletiva, similar à lipase de *Penicillium camembertii* (Lipase G), fornecida pela Amano Enzymes, que não catalisa a reação de transesterificação de óleos e gorduras, mas apresenta elevada atividade catalítica em reações de esterificação (Freitas et al., 2007). Estudos ainda devem ser realizados para a elucidação do mecanismo de BTL2 em meios não-convencionais e a sua aplicação nestes meios na obtenção de produtos de alto valor agregado.

5. CONCLUSÕES

O objetivo principal do trabalho foi a preparação e seleção de derivados de lipases imobilizados com elevada atividade catalítica e termoestáveis visando a síntese de biodiesel por etanolise dos óleos de babaçu e palma. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, e nesse conjunto de dados destacam-se:

- ⇒ Lipase de pâncreas de porco (LPP) foi totalmente inativada durante a imobilização em gel glioxil-agarose após 5 h de incubação em tampão bicarbonato pH 10,05. A substituição por tampão borato e adição de agentes protetores durante a imobilização não permitiu obter derivados com atividade catalítica.

- ⇒ O aumento do tempo de imobilização da lipase microbiana LTL em glioxil-agarose ativada com glicidol e epiclorigrina de 4 para 72 h, aumentou consideravelmente a estabilização térmica dos derivados. Em 24 h de imobilização foram obtidos os derivados mais termoestáveis de LTL (FE~300). Para as lipases Lipex[®] 100L, CALB, LTL e LPF o aumento do tempo de imobilização de 24 até 72 h não melhorou a estabilização térmica dos derivados. Por isso o tempo adotado para as imobilizações destas lipases em glioxil-agarose foi de 24 h. O processo de imobilização estabilizou a CALB de 15 a 23 vezes em relação à enzima solúvel. A estabilização térmica dos derivados de Lipex[®] 100L e LPF foi inferior a 10 vezes. Os derivados com maior atividade hidrolítica foram obtidos para a LTL e Lipex[®] 100L. Derivados obtidos por ativação com glutaraldeído apresentaram maior concentração de proteína imobilizada e, conseqüentemente menores valores de atividade hidrolítica devido à maior limitação difusional e/ou distorção da enzima. Na síntese de butirato de butila, o desempenho dos derivados preparados por LTL e LPF foi similar, apesar da baixa atividade catalítica dos derivados de LPF na hidrólise do azeite de oliva.

- ⇒ A aaminação química de lipases aumentou consideravelmente a estabilidade térmica de derivados de BTL2 preparados por imobilização em glioxil-agarose 10 BCL. CALB aminada imobilizada em glioxil-agarose (FE=289) foi ligeiramente mais estável que CALB não aminada (FE=211). No entanto, para BTL2 a imobilização da lipase aminada (FE=3460) foi muito mais estável termicamente do que a lipase não-aminada (FE=2648). A imobilização de CALB imobilizada em glioxil-sepabeads nas formas aminada e não-aminada não gerou derivados termoestáveis. A aaminação química também aumentou a estabilidade dos derivados em solventes orgânicos dioxano e etanol.
- ⇒ Na imobilização de LTL via glioxil em complexos polieletrólíticos de quitosana, o derivado mais ativo e estável termicamente foi preparado em quitosana-alginato hidrofobizado com TNBS e ativado por glicidol, epicloridrina e glutaraldeído (FE=45). O processo de modificação química com TNBS possibilitou a formação de um microambiente favorável à enzima, na geração de um suporte mais hidrofóbico ideal para a atividade catalítica de lipases.
- ⇒ Empregando suporte quitosana-alginato na imobilização de LTL via epóxi, inseridos por ativação com epicloridrina, a estabilidade térmica dos derivados foi inferiores aos obtidos via glioxil, mesmo variando o tempo de imobilização de 12 a 72 h, com fatores de estabilidade inferiores a 10. Entretanto, derivados preparados na imobilização de LTL e Lipex[®] 100L apresentaram valores de atividade hidrolítica similares aos obtidos em agarose.
- ⇒ A estabilização dos derivados de LTL em bagaço de cana e PHB via glioxil, próximos a 20 vezes mais estáveis que a enzima solúvel, foram ligeiramente inferiores aos preparados em glioxil-amino-toyopearl (FE=30). Em relação à agarose, seus derivados foram 10 vezes menos estáveis.
- ⇒ Adsorção hidrofóbica de lipases em suportes hidrofóbicos permitiu obter derivados altamente estáveis (FE~200), entretanto o custo das matrizes é superior àqueles testados

como agarose 6 BCL. Fenômeno de hiperativação interfacial foi observado para a LTL imobilizada nestas matrizes.

- ⇒ Um suporte hidrofóbico de baixo custo foi empregado para a imobilização de lipases, PHB nas formas granular e em pó. Os derivados preparados mostraram elevada atividade catalítica em meio aquoso (hidrólise) e em meio orgânico (esterificação). A geometria do suporte influenciou somente na atividade hidrolítica dos derivados (limitação difusional).

- ⇒ Um quadro resumo dos derivados preparados durante o trabalho foi feito (Quadro 4.1), comparando as propriedades catalíticas dos biocatalisadores com a finalidade de selecionar os derivados mais ativos em meio orgânico e aquoso, termoestáveis e de baixo custo. Foram selecionados os derivados de LTL preparados por ativação glioxil em agarose, amino-toyopearl e quitosana-alginato-TNBS ativada via glioxil (glicidol e epícloridrina) e glutaraldeído. Os derivados de LPF, apesar da baixa atividade hidrolítica e estabilidade também foram selecionados. Derivados de PHB preparados por adsorção física também foram selecionados por apresentarem alta atividade catalítica, fácil preparação e baixo custo.

- ⇒ Na síntese de biodiesel por etanolise dos óleos de babaçu e palma catalisada por derivados de LTL e LPF imobilizados em glioxil-agarose e glioxil-amino-toyopearl, não foi verificada influência significativa do tipo de suporte, lipase e agente de ativação, somente do tipo de óleo empregado. Em 24 h, quase todo o óleo de palma foi convertido em biodiesel e para o óleo de babaçu, a conversão variou entre 63,6 a 84,7%, mostrando que estas lipases testadas apresentaram maior especificidade pelos ácidos graxos contidos no óleo de palma.

- ⇒ Derivados de LTL preparados por imobilização em glioxil-quitosana-alginato-TNBS converteram todo óleo de palma em mono-ésteres de etila em 48 h de reação e para o derivado preparado por ativação glutaraldeído o rendimento máximo foi de 85%. Atribuiu-se estes resultados à redução do tamanho de poros do suporte durante a ativação pelo

glutaraldeído devido à sua elevada reatividade.

- ⇒ Na síntese de biodiesel também não foi verificada influência significativa do tipo de suporte. Máximas conversões foram obtidas em 72 h de reação para as lipases CALB, LPF e Lipex[®] 100L. LPF imobilizada em PHB granular obteve maior produtividade em 24 h. LTL converteu 85% do óleo de babaçu em mono-ésteres de etila ao final de 96 h. Lipase BTL2 não apresentou atividade de transesterificação, mas mostrou alta atividade catalítica em reações de esterificação.

- ⇒ Os valores de viscosidade cinemática obtidos para os mono-ésteres de etila obtidos foram inferiores a 4,5 cSt e de acordo com especificações recomendadas pela Agência Brasileira de Petróleo (ANP) para ser usado como biocombustível.

6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomendam-se as seguintes etapas:

- ⇒ Estudo de inativação térmica das lipases na temperatura adotada de síntese de biodiesel (45 °C);
- ⇒ Caracterização das propriedades bioquímicas (pH e temperatura ótima), massa molecular e concentração de resíduos lisina presentes na preparação enzimática Lipex[®] 100L;
- ⇒ Purificação da lipase LPF por adsorção em suportes hidrofóbicos e posterior imobilização covalente da enzima;
- ⇒ Purificação e aaminação química da lipase LPP adsorvida em matrizes hidrofóbicas;
- ⇒ Ensaio de carga máxima de BTL2 imobilizada em glioxil-agarose e aplicação destes derivados em meio orgânico;
- ⇒ Caracterização morfológica dos suportes obtidos em laboratório empregando as técnicas de infravermelho, MEV, DSC, TGA, BET e DRX;
- ⇒ Imobilização de outras lipases em bagaço de cana de açúcar previamente ativado e verificar a influência do tempo de imobilização sobre a estabilidade térmica dos derivados preparados em bagaço;
- ⇒ Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas (K_m e V_{max}) dos derivados mais ativos e estáveis termicamente;

- ⇒ Otimização das condições de síntese de biodiesel para os derivados testados por meio de planejamento experimental variando a concentração de enzima no reator, temperatura de reação e razão molar óleo:álcool;

- ⇒ Síntese de biodiesel em reatores contínuos com os derivados preparados de agarose;

- ⇒ Aplicação dos derivados termoestáveis preparados em reações em meio orgânico para a obtenção de produtos de alto valor agregado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adkins, N.L.; Johnson, C.N.; Georgel, P.T. Characterization of chromatin samples in the presence of *Drosophila* embryo extract by quantitative agarose gel electrophoresis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 67, p. 141-150, **2006**.

Adlercreutz, P. Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Guisan JM editor. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Totowa: Humana Press: **2006**. p. 251-256.

Adriano, W.S. *Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana*. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2008**.

Adriano, W.S.; Mendonça, D.B.; Rodrigues, D.S.; Mammarella, E.J.; Giordano, R.L.C. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 2170-2179, **2008**.

Aires-Barros, M.R. Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim de Biotecnologia*, v. 72, p. 2-13, **2002**.

Akoh, C.C.; Chang, S.W.; Lee, G.C.; Shaw, J.F. Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 8995-9005, **2007**.

Altun, G.D.; Cetinus, S.A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry*, v. 100, p. 964-971, **2007**.

Alvaro, G.; Blanco, R.M.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 26, p. 210-214, **1990**.

Andrewes, P.; Baldwin, A.; Broome, A.; Hill, B.; Holland, R.; Mills, O.; Newstead, D. Detection of lipase in skim and whole milk powders using triheptanoin as a substrate. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 587-595, **2007**.

Antczak, M.S.; Kubiak, A.; Antczak, T.; Bielecki, S. Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, v. 34, p. 1185-1194, **2009**.

Arroyo, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, v. 39, n. 2, p. 23-29, **1998**.

Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernandez-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisan, J.M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 58, p. 486-493, **1998**.

Becaro, A.A. *Imobilização/estabilização de D-hidantoinase para a produção de N-carbamoil-D-fenilglicina*. (Mestrado). Biotecnologia, UFSCar, São Carlos, **2008**.

Beppu, M.M.; Arruda, E.J.; Vieira, R.S.; Santos, N.N. Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. *Journal of Membrane Science*, v. 240, p. 227-235, **2004**.

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Peppas, N.A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19-34, **2004**.

Bickerstaff, G. Inter-esterification, enzyme technology. Department of Biological Sciences, University of Paisley. <http://www-biol.paisley.ac.uk/Courses/Enzymes/glossary/Esterif.htm>. Consultado em 25/03/2009.

Blanco, R.M.; Guisan, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, p. 360-366, **1988**.

Bornscheuer, U.E.; Bessler, C.; Srinivas, R.; Hari Krishna, S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*, v. 20, p. 433-436, **2002**.

Bosley, J.; Peilow, E.A.D. Immobilization of lipase on porous poly(propylene): reduction in esterification efficiency at low loading. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 74, p. 107-111, **1997**.

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

Brígida, A.I.S.; Pinheiro, A.D.T.; Ferreira, A.L.O, Pinto, G.A.S.; Gonçalves, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136-140, p. 67-80, **2007**.

Brockman, H.L. General features of lypolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. *In: Lipases*, B. Borgstrom and H.L. Brockman, Elsevier (eds.), Amsterdam, p. 3-46, **1984**.

Caballero, V.; Bautista, F.M.; Campelo, J.M.; Luna, D.; Marinas, J.M.; Romero, A.A.; Hidalgo, J.M.; Luque, R.; Macário, A.; Giordano, G. Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. *Process Biochemistry*. doi:10.1016/j.procbio.2008.11.015, **2009**.

Campagna-Filho, S.P.; Signini, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, p. 169-173, **2001**.

Carta, G.; Gainer, J.L.; Zaidi, A. Fatty acid esterification using lipase nylon immobilized. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p. 601-601, **1995**.

Chen, Y.; Xiao, B.; Chang, J.; Fu, Y.; Lv, P.; Wang, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, v. 50, p. 668–673, **2009**.

Chiou, S.-H.; Wu, W.-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, v. 25, p. 197-204, **2004**.

Christensen, M.W.; Andersen, L.; Husum, T.L.; Kirk, O. Industrial lipase immobilization. *European Journal of Lipid Science Technology*, v. 105, p. 318-321, **2003**.

Cunha, M.A.A.; da Silva, S.S.; de Carvalho, W.; dos Santos, J.C. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 26, p. 61-70, **2005**.

Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M.G.; Soldi, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, **2004**.

Da Rós, P.C.M. *Etanólise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de microondas*. (Mestrado). Engenharia Química, EEL-USP, Lorena, **2009**.

de Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C.; Aguiar, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, **2004**.

de Oliveira, I.R.W.Z.; Fernandes, S.C.; Vieira, I.C. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 366-372, **2006**.

Desai, P.D.; Dave, A.M.; Devi, S. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. *Food Chemistry*, v. 95, p. 193-199, **2006**.

Derewenda, U.; Swenson, L.; Green, R.; Wei, Y.; Yamaguchi, S.; Joerger, R.; Haas, M.J.; Derewenda, Z.S. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Engineering*, v. 7, p. 551-557, **1994**.

Dizge, N.; Aydiner, C.; Imer, D.Y.; Bayramoglu, M.; Tanriseven, A.; Keskinler, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1983-1991, **2009**.

Dizge, N.; Keskinler, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 1274-1278, **2008**.

Erdmann, H.; Vorderwerlbecke, T.; Schmid, R.; Kieslich, K. *In: Lipases: structure, mechanism and genetic engineering*, edited by L. Alberghing, R.D. Schmid and R. Verger, GBF. Monographs, Braunschweig Germany, v. 16, p. 425-428, **1990**.

Fangkangwanwong, J.; Yoksan, R.; Chirachanchai, S. Chitosan gel formation via the chitosan-epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. *Polymer*, v. 47, p. 6438-6445, **2006**.

Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C.M.; Rodriguez, V.; Santana, C.; Soler, G.; Bastida, A.; Guisan, J.M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 546-550, **1993**.

Fernandez-Lafuente, R.; Cowan, D.A.; Wood, A.N.P. Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 366–372, **1995**.

Fernandez-Lorente, Palomo, J.M.; Cabrera, Z.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, p. 242-250, **2007**.

Fernandez-Lorente, G.; Godoy, C.A.; Mendes, A.A.; Lopez-Gallego, F.; Grazu, V.; de las Rivas, B.; Palomo, J.M.; Hermoso, J.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 2553-2561, **2008**.

Foresti, M.L.; Ferreira, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 769-777, **2007**.

Freitas, L.; Mendes, A.A.; de Castro, H.F. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação com lipase imobilizada em resíduo agroindustrial. *Anais da Associação Brasileira de Química*, v. 52, p. 88-92, **2003**.

Freitas, L.; Paula, A.V.; dos Santos, J.C.; de Castro, H. F. Síntese de monoglicerídeos catalisada pela lipase de *Penicillium camembertii* por esterificação do glicerol com ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica. Simpósio Latino Americano de Ciências dos Alimentos, Campinas, Brasil, **2007**.

Freitas, S.P.; Silva, F.C.; Lago, R.C.A.; Couri, S. Efeito de enzimas hidrolíticas no comportamento reológico do óleo de palma cru. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, p. 127-130, **1998**.

Galvão, C.M.A. *Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes*. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2004**.

Gao, B.; Su, E.; Lin, J.; Jiang, Z.; Ma, Y.; Wei, D. Development of recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Proteus* sp. for biodiesel production. *Journal of Biotechnology*, v. 139, p. 169-175, **2009**.

George, M.; Abraham, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, **2006**.

Gonçalves, V.L.; Laranjeira, M.C.M.; Fávere, V.T.; Pedrosa, R.C. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, p. 6-12, **2005**.

Gomes, F.M.; Pereira, E.B.; de Castro, H.F. Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. *Biomacromolecules*, v. 05, n. 02, p. 17-23, **2004**.

Grazu, V.; Abian, O.; Mateo, C.; Batista-Viera, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1495-1501, **2003**.

Guisan, J.M. Aldehyde gels as activated support for immobilization–stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, p. 375–382, **1988**.

Guisan, J.M. Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Guisan JM editor. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Totowa: Humana Press: **2006**. p. 1-13.

Gupta, K.C.; Jabrail, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 43-54, **2006**.

Halim, S.F.A.; Kamaruddin, A.H.; Fernando, W.J.N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 710-716, **2009**.

Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, **2006**.

Iso, M.; Chen, B.; Eguchi, M.; Kudo, T.; Shrestha, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 16, p. 53-58, **2001**.

Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; Heuvelm, M.O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.15, p. 29-63, **1994**.

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

Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W.; Reetz, M.T. Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, v. 53, p. 315-351, **1999**.

Kathuria, N.; Tripathi, A.; Kar, K.K.; Kumar, A. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 406-418, **2009**.

Kai, Z.; Ying, D.; Guo-Qiang, C. Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 115–123, **2003**.

Kazlauskas, R.J.; Bornscheuer, U.T. *Biotransformation with lipases*, In: Rehm HJ, Pihler G., Stadler A., Kelly P.J.W. (eds). New York, v. 8, p. 37-192, **1998**.

Klibanov, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, v. 409, p. 241-246, **2001**.

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

Kulkarni, A.R.; Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Dave, A.M.; Metha, M.H. Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *Journal of Controlled Release*, v. 63, p. 97–105, **2000**.

Kumar, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27, **2000**.

Kumar Modi, M.; Reddy, J.R.C.; Rao, B.V.S.K.; Prasad, R.B.N. Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. *Biotechnology Letters*, v. 28, p. 637-640, **2006**.

Kumar Modi, M.; Reddy, J.R.C.; Rao, B.V.S.K.; Prasad, R.B.N. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1260–1264, **2007**.

Latif, F.; Rajoca, M. I. Production of ethanol and xylitol from corncobs by yeasts. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 57-63, **2001**.

Li, N.; Bai, R. A novel amine-shielded surface cross-linking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 44, p. 6692-6700, **2005**.

Lopez-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, v. 116, n. 1, p. 1-10, **2005**.

Lu, J.; Nie, K.; Xie, F.; Wang, F.; Tan, T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1367–1370, **2007**.

Ma, F.; Hanna, M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1-15, **1999**.

Macario, A.; Moliner, M.; Corma, A.; Giordano, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 118, p. 334-340, **2009**.

Malcata, F.X.; Reyes, H.R.; Garcia, H.S.; Hill Jr., C.G.; Amundson, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. A review. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 67, n. 12, p. 890-910, **1990**.

Manrich, A.; Galvão, C.M.A.; Jesus, C.D.F.; Giordano, R.C.; Giordano, R.L.C. Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, p. 54-61, **2008**.

Marchetti, J.M.; Miguel, V.U.; Errazu, A.F. Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 11, p. 1300-1311, **2007**.

Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 509-515, **2000**.

Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Tam, A.; Damiani, M. Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress*, v. 18, p. 629-634, **2002**.

Mateo, C.; Torres, R.; Fernandez-Lorente, G.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Hidalgo, A.; Lopez-Gallego, F.; Abian, O.; Palomo, J. M.; Betancor, L.; Pessela, B.C.C.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 772-777, **2003**.

Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V.; Lopez-Gallego, F.; Pessela, B.C.C.; Hidalgo, A.; Fernandez-Lorente, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 274-280, **2006**.

Mateo, C.; Grazu, V.; Palomo, J.M.; Lopez-Gallego, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature Protocols*, v. 2, p. 1022-1033, **2007a**.

Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1451-1463, **2007b**.

Meher, L.C.; Sagar, D.V.; Naik, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, v. 10, p. 248-268, **2006**.

Mendes, A.A.; Rodrigues, D.S.; Adriano, W.S.; Mammarella, E.J.; de Castro, H.F.; Giordano, R.L.C. Covalent Attachment of *Aspergillus oryzae* Lipase on Chemically Bound Hybrid Matrices. 10th International Conference on Chitin and Chitosan, Montpellier-FR, Livro de Abstracts, v. 1. p. 95-96, **2006**.

Mendes, A.A.; Barbosa, B.C.M.; da Silva, M.L.C.P.; de Castro, H.F. Morphological, biochemical and kinetic properties of lipase from *Candida rugosa* immobilized in zirconium phosphate. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 25, p. 393-400, **2007**.

Mendes, A.A.; Rodrigues, D.S.; Adriano, W.S.; de Castro, H.F.; Giordano, R.L.C. Influência do tipo de suporte e dos métodos de ativação sobre as propriedades catalíticas de lipase imobilizada multipontualmente. XXI Simpósio Iberoamericano de Catálise, Málaga-Espanha, **2008a**.

Mendes, A.A.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; de Castro, H.F.; Giordano, R.L.C. Imobilização multipontual de lipases em géis glioxil: influência da aminação química sobre a estabilidade térmica e em solventes orgânicos. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, **2008b**.

Mendes, A.A.; Adriano, W.S.; de Castro, H.F.; Giordano, R.L.C. Estratégias para a obtenção de derivados termoestáveis de lipase imobilizada em matriz híbrida quitosana-alginato epoxilada. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, CD-ROM, **2008c**.

Mendes, A.A.; Da Rós, P.C.M.; da Silva, G.A.M.; Giordano, R.L.C.; de Castro, H.F. Enzymatic transesterification of babassu oil using immobilized lipases on poly-(hydroxybutyrate) by physical adsorption. VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, v. 1, p. 179-180, **2008d**.

Mi, F.-L.; Sung, H.-S.; Shyu, S.-S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*, v. 48, p. 61-72, **2002**.

Monteiro Jr., O.A.C.; Airoidi, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 119-128, **1999**.

Moreira, A.B.R.; Perez, V.H.; Zanin, G.M.; de Castro, H.F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on Silica-PVA composite. *Energy and Fuels*, v. 21, p. 3689-3694, **2007**.

Nasreddine, S.; Karout, A.; Christ, M.L.; Pierre, A.C. Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase. *Applied Catalysis A: General*, v. 344, p. 70-77, **2008**.

Palomo, J.M.; Muñoz, G.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19-20, p. 279-286, **2002**.

Palomo, J.M.; Fuentes, M.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1-6, **2003**.

Palomo, J.M.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. *Journal of Chromatography A*, v. 1038, n. 1-4, p. 267-273, **2004**.

Palomo, J.M.; Ortiz, C.; Fernandez-Lorente, G.; Fuentes, M.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, n. 4, p. 447-454, **2005**.

Park, E.Y.; Sato, M.; Kojima, S. Lipase-catalyzed biodiesel production from waste activated bleaching earth as raw material in a pilot plant. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3130–3135, **2008**.

Paula, A.V.; Urioste, D.; Santos, J.C.; de Castro, H.F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 281-288 **2007**.

Pedroche, J.; Yust, M.M.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Giron-Calle, J.; Alaiz, M.; Vioque, J.; Guisan, J.M.; Millan, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1160-1166, **2007**.

Pereira, E.B.; Zanin, G.M.; de Castro, H.F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 20, p. 343-355, **2003**.

Perez, V.H.; da Silva, G.S.; Gomes, F.M.; de Castro, H.F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. *Biochemical Engineering Journal*, v. 34, p. 13-19, **2007**.

Qin, H.; Yan, X.; Yun, T.; Dong, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chinese Journal of Catalysis*, v. 29, p. 41–46, **2008**.

Rajan, M. Global market for industrial enzymes to reach \$2.4 million by 2009. Business Communications Company, Inc. RC-147U Enzymes for Industrial Applications. <http://www.bccresearch.com/editors/RC-147U.html>. Consultado em 14 de janeiro de 2008.

Ranganathan, S.V.; Narasimhan, S.L.; Muthukumar, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3975 -3981, **2008**.

Rodrigues, D.S.; Mendes, A.A.; Adriano, W.S.; Gonçalves, L.R.B.; Giordano, R.L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 51, p. 100-109, **2008**.

Royon, D.; Daz, M.; Ellenrieder, G.; Locatelli, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 648–653, **2007**.

Rúa, M.L.; Schmidt-Dannert, C.; Wahl, S.; Sprauer, A.; Schmid, R.D. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*: large-scale production, purification and properties - aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*, v. 56, p. 89-102, **1997**.

Sadana, A.; Henley, J.P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 30, p. 717-723, **1987**.

Salis, A.; Svensson, I.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; Adlercreutz, P. The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1646, p. 145-151, **2003**.

Salis, A.; Pinna, M.; Monduzzi, M.; Solinas, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 54, p. 19–26, **2008**.

Secundo, F.; Miehé-Brendlé, J.; Cheralu, C.; Ferrandi, E.E.; Dumitriu, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 109, p. 350-361, **2008**.

Selmi, B.; Gontier, E.; Ergan, F.; Thomas, D. Enzymatic synthesis of tricaprilyn in solvent-free system: Lipase regiospecificity as controlled by glycerol adsorption on silica-gel. *Biotechnology Techniques*, v. 11, p. 543-547, **1997**.

Shao, P.; Meng, X.; He, J.; Sun, P. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. *Food and Bioproducts Processing*, v. 86, p. 283-289, **2008**.

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

Squio, C.R.; de Aragão, G.M.F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxi-butirato) e poli(3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) por bactérias. *Química Nova*, v. 27, p. 615-622, **2004**.

Soares, C.M.F.; de Castro, H.F.; Zanin, G.M.; de Moraes, F.F. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77/79, p. 745-757, **1999**.

Soares, C.M.F.; Santana, M.H.A.; Zanin, G.M.; de Castro, H.F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. *Química Nova*, v. 23, p. 832-838, **2003**.

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

Sundberg, L.; Porath, J. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *Journal of Chromatography A*, v. 90, p. 87-98, **1974**.

Tapia, C.; Escobar, Z.; Costa, E.; Sapag-Hagar, J.; Valenzuela, F.; Basualto, C.; Gai, M.N.; Yazdani-Pedram, M. Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan–alginate and chitosan–carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 65-75, **2004**.

Tardioli, P.W.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Giordano, R.L.C. Design of new immobilized–stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 565–574, **2003a**.

Tardioli, P.W.; Pedroche, J.; Giordano, R.L.C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Hydrolysis of proteins by immobilized–stabilized alcalase-glyoxyl agarose. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 352–360, **2003b**.

Ting, W.J.; Huang, C.M.; Giridhar, N.; Wu, W.T. An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v. 39, p. 203–210, **2008**.

Torres, R.; Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Palomo, J.M.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. A novel heterofunctional epoxy-amino sepabeads for a new enzyme immobilization protocol: Immobilization-stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 1056-1060, **2003**.

Tsigos, I.; Martinou, A.; Kafetzopoulos, D.; Bouriotis, V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 18, p. 305-312, **2000**.

Urioste, D.; Castro, M.B.A.; Biaggio, F.C.; de Castro, H.F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. *Química Nova*, v. 31, p. 407-412, **2008**.

Vasudesan, P.T.; Briggs, M. Biodiesel production - current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 421–430, **2008**.

Vemuri, G.; Banerjee, R.; Bhattacharyya, B.C. Immobilization of lipase using egg shell and alginate as carriers: Optimization of reaction conditions. *Bioprocess Engineering*, v. 19, p. 111-114, **1998**.

Verger, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, v. 15, p. 32-38, **1997**.

Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Haas, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, **2000**.

Vogel, A.I. *Análise Inorgânica Quantitativa*. Editora Guanabara Dois, Rio de Janeiro, **1981**.

Vold, I.M.N.; Christensen, B.E. Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 679-684, **2005**.

Volkin, D.B.; Staubli, A.; Langer, R.; Klibanov, A.M. Enzymatic thermoinactivation in anhydrous organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 37, p. 843-853, **1991**.

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

Wang, Y.; Wu, H.; Zong, M.H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 7232–7237, **2008**.

Winayanuwattikun, P.; Kaewpiboon, C.; Piriyakananon, K.; Tantong, S.; Thakernkarnkit, W.; Chulalaksananukul, W.; Yongvanich, T. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 1279-1286, **2009**.

www.separations.us.tosohbioscience.com. Consultado em 03 de abril de 2008.

www.tosohbioscience.com. Consultado em 04 de abril de 2008.

Xia, J.; Chen, X.; Nnanna, I. A. Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 73, n. 1, p.115-120, **1996**.

Xu, X. Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 105, p. 289-304, **2003**.

Yahya, A.R.M.; Anderson, W.A.; Moo-Young, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p.438-450, **1998**.

Yesiloglu, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2155-2159, **2005**.

Zaks, A.; Klibanov, A.M. Enzyme-catalyzed processes in organic media. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 82, p. 3192-3196, **1985**.

Zheng, Y.; Quan, J.; Ning, X.; Zhu, L.-M.; Jiang, B.; He, Z.-Y. Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in tert-amyl alcohol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 41-46, **2009**.