

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

VINICIUS VESCOVI

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASES VEGETAIS DESTINADAS À SÍNTESE DE
BIODIESEL E ÉSTERES

SÃO CARLOS-SP

2012

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

VINICIUS VESCOVI

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASES VEGETAIS DESTINADAS À SÍNTESE DE
BIODIESEL E ÉSTERES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli.

SÃO CARLOS-SP
2012

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

V575ep Vescovi, Vinicius.
Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais
destinadas à síntese de biodiesel e ésteres / Vinicius
Vescovi. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
79 f.

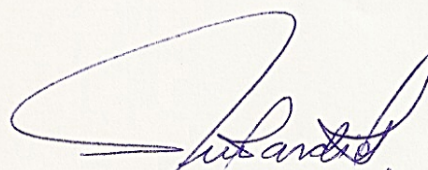
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2012.

1. Engenharia química. 2. Extração. 3. Enzimas -
purificação. 4. Lipase. 5. Imobilização. 6. Adsorção
hidrofóbica. I. Título.

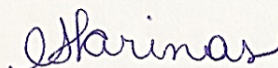
CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **VINÍCIUS VESCOVI** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 30 DE MARÇO DE 2012.

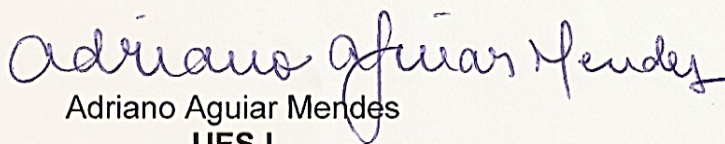
BANCA EXAMINADORA:



Paulo Waldir Tardioli
Orientador, UFSCar



Cristiane Sanchez Farinas
EMBRAPA



Adriano Aguiar Mendes
UFSJ

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Processos Enzimáticos (LabEnz) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Contou com o apoio financeiro do programa **PRH-ANP/MCT N° 44**.



AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso agradeço primeiramente a todos de coração.

Agradeço a toda minha família pelo apoio, em especial, aos meus pais pela determinação e luta na minha formação e também pelo apoio incondicional durante essa longa caminhada, e os meus avós pelos conselhos e ensinamentos.

Ao Professor Paulo que tanto contribuiu para o meu crescimento durante a orientação dessa dissertação e pela sua enorme paciência.

Aos companheiros de república Gabriel, Carlos e o agregado Alfredo, pela companhia, amizade, apoio e pelos importantes momentos de descontração.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pela confiança.

À Agência Nacional do Petróleo – ANP – e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – que por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo, Gás e Biocombustíveis – PRH-ANP/MCT, financia o PRH 44 - Formação de Pessoal em Biocombustíveis

RESUMO

Lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) catalisam reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. As lipases podem ser obtidas de fontes animais, microbianas e vegetais, sendo que as de origem microbiana representam a grande maioria das lipases produzidas atualmente. No entanto, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é restrito devido ao alto custo de produção, favorecendo, assim, a busca por novas fontes de lipase. Este trabalho teve por objetivo a utilização de sementes de oleaginosas como fontes de lipases, visando sua aplicação na síntese de ésteres de ácidos graxos e hidrólise de óleos vegetais. Inicialmente sementes de soja, girassol e mamona foram trituradas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7, seguida por agitação de 11 horas em temperatura ambiente. Sob essas condições, as produtividades médias foram de aproximadamente 237, 100 e 81 U/g de sementes secas. Os sólidos foram removidos do extrato enzimático bruto por filtração e o extrato enzimático foi clarificado por centrifugação. O extrato clarificado foi purificado por ultrafiltração em membrana de polipropileno com diâmetro de corte de 100 kDa. Esse procedimento permitiu a recuperação de 40, 35 e 11% da atividade inicialmente presente nos extratos enzimáticos brutos obtidos a partir de sementes de soja, girassol e mamona, respectivamente. Lipases de sementes de soja, girassol e mamona foram imobilizadas por adsorção hidrofóbica em sílica ativada com grupos octil (sílica-octil), obtendo-se biocatalisadores com atividades recuperadas de 683%, 413% e 1494%, respectivamente. Eletroforese SDS-PAGE do extrato enzimático da soja e ensaios de atividade durante a imobilização em sílica-octil sugeriram a presença de duas isoformas de lipases, com massas moleculares de aproximadamente 20 e 30 kDa. O pH e a temperatura de máximas atividades hidrolíticas do extrato enzimático da soja foram de 8,0 e 47°C, respectivamente, enquanto para a enzima imobilizada foram de 6,0 e 57°C, respectivamente. O tempo de meia-vida da enzima imobilizada a 50°C e pH 7 foi de 8 h. Na síntese de butirato de butila, realizada a 40°C, obteve-se uma conversão de aproximadamente 15% em 9 h de reação. A produtividade de lipases de sementes de soja pode ser aumentada por germinação das sementes por 12 h, seguida da extração a 25°C por 12 h com solução salina (tampão fosfato de sódio, pH 7,0) com uma concentração de 100 mM e adição de Tris-HCl 1% (m/v).

Palavras-chave: Extração; Purificação; Lipase vegetal; Imobilização; Adsorção hidrofóbica; Sílica-octil.

ABSTRACT

Lipases (triacyl-glycerol-hydrolases) are enzymes that catalyze hydrolysis, esterification and transesterification reactions. Lipase can be obtained from animals, microbial and vegetable sources. Nowadays, commercial lipases are majority produced from microbial sources. The use of these enzymes in industrial scale is still limited because of its high cost of production, favoring then, the search for new sources of lipases. This work aimed the utilization of oilseeds as lipase sources, aiming its use in the synthesis of fatty esters and in the hydrolysis of vegetable oils. To achieve this goal, the protein content of seeds of sunflower, castor bean and soybean was solubilized in buffered medium. The oilseeds were crushed in the presence of sodium phosphate buffer pH 7.0 (50 mM), followed by 11 h-constant stirring at room temperature. Under these conditions, the average productivities were ca. 237, 100 and 81 U/g of dried seeds. The solids were withdrawal from the crude extract by filtration, followed by centrifugation. The clarified crude extract was purified by ultrafiltration in 100 kDa cut-off polypropylene membrane. This procedure allows an activity recovery of 40, 35 and 11% for soybean, sunflower and castor bean, respectively. The purified lipases from soybean, sunflower and castor bean seeds were immobilized on hydrophobic support (silica-octyl) by interfacial adsorption, yielding biocatalysts with recovered activities of 683%, 413% and 1494%, respectively. SDS-PAGE electrophoresis and activity assays during the immobilization of the purified lipases on silica-octil suggested the presence of two lipase isoforms with molecular weights around of 20 and 30 kDa. Soluble soybean lipase exhibited optimum pH and temperature for hydrolysis of olive oil around 8.0 and 47 °C, respectively, while for immobilized soybean lipase (derivative) were 6.0 and 57°C, respectively. The half-life of the immobilized lipase at 50°C and pH 7 was around 8 h. The synthesis of butyl butyrate at 40°C catalyzed by immobilized lipase yield a conversion of approximately 15% after 9 h of reaction. The productivity of lipases from soybean seeds can be increased by germination of the seeds for 12 h, followed by extraction at 25°C for 12 h with salt solution (sodium phosphate buffer pH 7.0) at 100 mM concentration, supplemented with 1% (m/v) Tris-HCl.

Keywords: Extraction; Purification; Plant lipase; Immobilization; Hydrophobic adsorption; Silica-octyl.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipase..... | 7 |
| Figura 2 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica..... | 8 |
| Figura 3 - Mecanismo catalítico da lipase. (a) ataque nucleofílico da hidroxila da serina ao carbono suscetível da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil enzima e ataque nucleofílico da água; (d) intermediário tetraédrico; (e) enzima livre. | 9 |
| Figura 4 - Superposição dos esqueletos das lipases de <i>Rhizomucor miehei</i> (a) e de pâncreas humano (b), mostrando a mudança conformacional da tampa da enzima. A tampa esta destacada em verde. | 10 |
| Figura 5 - Atividade em função do tempo de germinação. | 13 |
| Figura 6 - Classificação dos suportes para a imobilização de enzimas. | 22 |
| Figura 7 - Adsorção interfacial de lipase sobre uma superfície hidrofóbica. | 24 |
| Figura 8 - Reação de alcoólise e transesterificação..... | 27 |
| Figura 9 - Produção de biodiesel por transesterificação alcalina (A) e enzimática (B) de óleos e gorduras. | 28 |
| Figura 10 - Número de publicações entre 1996 e 2011 usando como palavras chave lipase e biodiesel. | 29 |
| Figura 11 – Diagrama de blocos do processo (I) de extração e purificação de lipases vegetais..... | 34 |
| Figura 12 – Diagrama de blocos do processo (II) de extração e purificação de lipases vegetais..... | 35 |
| Figura 13 - Esquema geral de funcionamento do sistema de ultrafiltração tangencial. | 36 |
| Figura 14 – Perfis de proteínas e atividade hidrofóbica no sobrenadante de imobilização de lipase de soja em octil-sílica (25°C, pH 7,0)..... | 47 |
| Figura 15 – Eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%) dos extratos enzimáticos de sementes de soja..... | 50 |
| Figura 16 – Perfis de atividade em função da temperatura (pH 7,0) e do pH (37° C). Atividades medidas com azeite de oliva como substrato. A maior atividade foi tomada como 100%. | 51 |
| Figura 17 – Estabilidade térmica de lipase de soja solúvel e imobilizada em octil-sílica, a 50°C, pH 7,0. | 53 |
| Figura 18 – Consumo de butanol na síntese de butirato de butila a 40°C em heptano. Relação ácido butírico/n-butanol = 1,5 (mol/mol), concentração de biocatalisador = 0,05 g/ml..... | 53 |
| Figura 19 – Efeito da força iônica na extração de lipases de grãos de soja..... | 55 |
| Figura 20 – Efeito da germinação na extração da lipase a partir da semente de soja (% em relação a maior atividade)..... | 56 |
| Figura 21 – Efeito do tempo na extração da lipase a partir da semente de soja..... | 57 |
| Figura 22 – Efeito da adição de aditivos no tampão de extração (fosfato de sódio 50 mM) de lipases a partir de sementes de soja. | 58 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Aplicações industriais da lipases. | 6 |
| Quadro 2 - Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial. | 25 |
| Quadro 3 - Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção do biodiesel. | 29 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Extração de lipases a partir de diferentes vegetais. | 15 |
| Tabela 1 – Extração de lipases a partir de diferentes vegetais (Continuação). | 16 |
| Tabela 1 – Extração de lipases a partir de diferentes vegetais (Continuação). | 17 |
| Tabela 2 – Purificação de lipases a partir de diferentes vegetais. | 19 |
| Tabela 2 – Purificação de lipases a partir de diferentes vegetais (Continuação). | 20 |
| Tabela 3 - Produção anual de biodiesel em m ³ no Brasil nos últimos anos. | 25 |
| Tabela 4 – Produtividade de lipases de sementes de oleaginosas, atividades específicas dos extratos enzimáticos (bruto e purificado) e parâmetros de purificação. | 43 |
| Tabela 5 – Atividades totais (em Unidades) e rendimentos de extração e purificação de lipases de sementes de oleaginosas (soja, girassol e manona) | 44 |
| Tabela 6 – Parâmetros da imobilização de lipases vegetais em octil-sílica (25°C, pH 7, 15 horas) | 45 |
| Tabela 7– Produtividade de lipase de grãos de soja, atividades específicas dos extratos enzimáticos (bruto e purificado) e parâmetros de purificação. | 46 |
| Tabela 8 – Parâmetros da imobilização de lipase de soja em octil-sílica (25°C, pH 7, 2,5 horas) | 48 |
| Tabela 9 Comparativo do efeito da temperatura na extração de lipase a partir de sementes de soja..... | 55 |
| Apêndice 1 - Lipases de origem vegetal..... | 75 |
| Anexo 1 - Lipases obtidas a partir de fungos | 78 |
| Anexo 2 - Lipases obtidas a partir de bactérias | 79 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Objetivos | 3 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1 Enzimas | 4 |
| 2.2 Lipases | 6 |
| 2.2.1 Reações catalisadas por lipases | 6 |
| 2.2.2 Especificidade das lipases | 7 |
| 2.2.3 Mecanismo de reação das lipases | 8 |
| 2.2.4 Estrutura das lipases | 10 |
| 2.2.5 Fontes vegetais de lipases | 11 |
| 2.2.5.1 Germinação | 11 |
| 2.2.5.2 Extração de lipases vegetais..... | 13 |
| 2.2.5.3 Purificação de lipases | 18 |
| 2.3 Imobilização enzimática | 21 |
| 2.4 Imobilização de lipases..... | 23 |
| 2.5 Biodiesel | 24 |
| 2.5.1 Matérias-primas para a produção do biodiesel..... | 26 |
| 2.5.2 Processo de produção do biodiesel | 26 |
| 2.6 Produção de ésteres..... | 30 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 3.1 Material | 31 |
| 3.1.1 Sementes, suporte e substratos | 31 |
| 3.1.2 Reagentes específicos e membranas..... | 31 |
| 3.2 Métodos | 32 |
| 3.2.1 Determinação da concentração de proteína | 32 |
| 3.2.2 Determinação das atividades hidrolíticas..... | 32 |
| 3.2.2.1 Hidrólise do azeite de oliva | 32 |
| 3.2.2.2 Hidrólise do butirato de <i>p</i> -nitrofenila (PNPB)..... | 33 |
| 3.2.3 Eletroforese SDS - PAGE..... | 33 |
| 3.2.4 Extração e purificação de lipases vegetais..... | 34 |
| 3.2.4.1 Extração..... | 35 |
| 3.2.4.2 Purificação | 36 |
| 3.2.4.2.1 Centrifugação | 36 |
| 3.2.4.2.2 Ultrafiltração | 36 |
| 3.2.4.3 Produtividade | 37 |
| 3.2.4.4 Avaliação de diferentes parâmetros na extração de lipase vegetal | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.4.4.1 Efeito da temperatura | 37 |
| 3.2.4.4.2 Efeito da força iônica | 38 |
| 3.2.4.4.3 Efeito da germinação | 38 |
| 3.2.4.4.4 Efeito do tempo | 38 |
| 3.2.4.4.5 Efeito da presença de aditivos..... | 38 |
| 3.2.5 Imobilização de lipase em suporte hidrofóbico..... | 39 |
| 3.2.5.1 Modificação química da superfície da sílica com grupos octil..... | 39 |
| 3.2.5.2 Imobilização de lipase em octil-sílica | 39 |
| 3.2.5.3 Cálculo dos parâmetros de imobilização | 39 |
| 3.2.5.3.1 Rendimento de imobilização em termos de proteína | 39 |
| 3.2.5.3.2 Rendimento de imobilização em termos de atividade | 40 |
| 3.2.5.3.3 Atividade recuperada..... | 40 |
| 3.2.6 Caracterização da lipase isolada (solúvel e imobilizada) | 40 |
| 3.2.7 Aplicação de lipase de soja imobilizada na produção de ésteres..... | 41 |
| 3.2.7.1 Produção de biodiesel (mistura de ésteres etílicos) | 41 |
| 3.2.7.2 Produção de butirato de butila | 41 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 4.1 Extração de lipases a partir de sementes de oleaginosas | 42 |
| Todas as etapas foram realizadas em triplicatas e os desvios padrões não excederam a 6% ... | 44 |
| 4.2 Extração, purificação, imobilização e caracterização de lipase isolada de grãos de soja | 45 |
| 4.2.1 Imobilização em sílica-octil de lipase de soja purificada pelo processo II | 46 |
| 4.2.2 Eletroforese..... | 48 |
| 4.2.3 Propriedades catalíticas do extrato enzimático e da lipase imobilizada | 50 |
| 4.2.3.1 Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase livre e imobilizada | 51 |
| 4.2.3.2 Estabilidade térmica..... | 52 |
| 4.2.4 Síntese do butirato de butila | 53 |
| 4.2.5 Produção de biodiesel..... | 54 |
| 4.3 Extração de lipases a partir de sementes de soja | 54 |
| 4.3.1 Efeito da temperatura..... | 54 |
| 4.3.2 Efeito da força iônica | 55 |
| 4.3.3 Efeito da germinação | 55 |
| 4.3.4 Efeito do tempo | 56 |
| 4.3.4 Efeito da presença de aditivos..... | 57 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 59 |
| 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTURO | 61 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| 7 REFERÊNCIAS | 62 |
| APÊNDICES | 75 |
| ANEXOS | 78 |

1 INTRODUÇÃO

Uma gama de produtos de interesse econômico (ácidos orgânicos, ésteres, biocombustíveis, antibióticos, vitaminas, aromas, proteínas, dentre muitos outros) pode ser obtida a partir de processos que utilizam microrganismos, células animais, vegetais, ou enzimas.

A grande motivação pelo uso de enzimas deve-se, dentre outras vantagens, à redução do consumo energético do processo, pois enzimas atuam em condições brandas de temperatura e pressão, e à redução dos custos na etapa de purificação do produto final, pois, devido à alta seletividade e especificidade das enzimas, não há a formação de subprodutos indesejáveis.

O uso de enzimas industriais tem-se intensificado nos últimos anos. O mercado global dessas enzimas atingiu US\$ 3,6 bilhões em 2010, e espera-se que em 2016 atinja US\$ 6 bilhões (BCC RESEARCH, 2011).

Dentre as diversas enzimas industriais, comercializadas mundialmente, merecem destaque as proteases, amilases, celulasas e lipases. A utilização de lipases nos setores de alimentos, bebidas e produtos de limpeza, e ainda, avanços biotecnológicos na área de biocombustíveis, alavancaram o crescimento do mercado mundial desta enzima.

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C 3.1.1.3), enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, destacam-se dentre as enzimas mais investigadas e com vasto potencial de aplicação industrial. Diante da versatilidade das reações catalisadas pela lipases, a aplicação industrial destas enzimas estende-se a vários setores. Reações catalisadas por lipases podem ser usadas industrialmente para vários propósitos, tais como, hidrólise de óleos e gorduras, síntese de ésteres de ácidos graxos como ingredientes de cosméticos ou surfactantes, produção de intermediários para síntese orgânica, etc. (BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2002).

Outra característica marcante das lipases é a sua ativação na presença de interfaces hidrofóbicas (micelas de substrato, solventes orgânicos imiscíveis, etc.). Na ausência de interfaces, o sítio ativo das lipases é frequentemente coberto por uma “tampa”, tornando-o inacessível ao substrato. Entretanto, na presença de interfaces hidrofóbicas a estrutura tridimensional da lipase é rearranjada, levando à abertura da “tampa”. Essas mudanças conformacionais expõem superfícies hidrofóbicas da enzima que podem interagir com interfaces hidrofóbicas, conferindo funcionalidade à enzima (BASTIDA et al., 1998).

Enzimas são estruturas frágeis, facilmente inativadas em condições extremas de pH e temperatura. Além disso, são solúveis e estão em baixa concentração no meio reacional, o que torna sua recuperação inviável do ponto de vista econômico. Esses inconvenientes podem ser contornados ou pelo menos minimizados com a imobilização da enzima em um suporte sólido. Enzimas imobilizadas são normalmente mais estáveis que as solúveis, podem ser facilmente recuperadas e reutilizadas em várias bateladas, permitem fácil controle do processo (formação de menos subprodutos), redução do volume reacional e utilização de diferentes configurações de reatores (batelada, leito fixo, fluidizado, etc.) (ZANIN; MORAES, 2004). Lipases podem ser imobilizadas por vários métodos, incluindo adsorção, ligação covalente ou encapsulamento (PALOMO et al. 2002; MATEO et al. 2007; MENDES, 2009). Entretanto, devido ao seu mecanismo de ativação interfacial, as lipases podem ser seletivamente imobilizadas sobre superfícies hidrofóbicas, podendo-se obter em uma única etapa purificação, ativação e estabilização da enzima (BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2002; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2008, CABRERA et al., 2009). A adsorção interfacial envolve regiões hidrofóbicas que circundam o sítio ativo da enzima e a face interna da “tampa”. Portanto, lipases adsorvem-se a superfícies hidrofóbicas com a tampa aberta (forma ativa), tornando o sítio catalítico acessível a pequenos substratos, mesmo que este esteja voltado para o suporte (VERGER et al., 1997; BASTIDA et al., 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2008, CABRERA et al., 2009).

Lipases podem ser obtidas de tecidos vegetais (tecidos de reserva) e animais (pancreática, hepática, e gástrica) ou produzidas por fermentação de fungos e bactérias (SHARMA; CHIST; BANERJEE, 2001; PAQUES; MACEDO, 2006; POLIZELLI, 2008). O alto custo de isolamento e purificação de enzimas microbianas e animais podem restringir sua aplicação industrial em larga escala. Entretanto, esse custo pode ser reduzido pelo uso de lipases vegetais, que podem ser obtidas a partir de fontes renováveis produzidas em larga escala e as quais não exigem alto grau de purificação (CARO et al., 2000), e utilizando-se ainda de métodos de purificação mais simples e com custos mais baixos, como por exemplo a utilização da ultrafiltração em membranas. Diante de tal contexto este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de uma lipase imobilizada de baixo custo com propriedades adequadas para sua aplicação em síntese de ésteres e biodiesel.

1.1 Objetivos

- (i) Seleção de fontes vegetais produtoras de lipases;
- (ii) Preparação de suporte hidrofóbico e funcionalizado à base de sílica;
- (iii) Extração, purificação e imobilização de lipases obtidas a partir das sementes selecionadas em (i);
- (iv) Seleção da melhor semente a ser utilizada nas sínteses de éster e biodiesel;
- (v) Caracterização (pH e temperatura ótimos) da lipase selecionada em (iv);
- (vi) Uso do biocatalisador em reações de esterificação e transesterificação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

Enzimas desempenham a função de catalisarem reações biológicas através da quebra ou junção de moléculas para formar novos compostos, combinando-se transitoriamente com os reagentes para produzir um estado de transição que apresenta uma energia de ativação, energia necessária para que se rompa ou forme uma ligação química, menor que a do estado de transição da reação não catalisada, acelerando assim as reações. Um bom exemplo para tal aceleração foi à comparação feita por LEHNINGER (1976), onde a decomposição do peróxido de hidrogênio foi realizada primeiramente na ausência de catalisador, sendo depois utilizado um catalisador químico (platina) e por fim a decomposição na presença de um catalisador enzimático (catalase). O resultado observado foi que o uso da platina reduziu a energia livre de ativação da reação de 75,2 kJ/mol (decomposição realizada sem a catalisador) para 48,9 kJ/mol, enquanto que o uso de catalase reduziu a energia livre da decomposição do peróxido de hidrogênio para 23,0 kJ/mol.

A complexa estrutura molecular enzimática é majoritariamente constituída por uma parte proteica, porém a ela podem estar associadas outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. Para apresentar atividade catalítica, algumas enzimas requerem a participação de moléculas menores (cofatores) de natureza não proteica, como íons inorgânicos (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+}) ou moléculas orgânicas (NELSON; COX, 2011).

As proteínas são heteropolímeros formados por aminoácidos ligados entre si por meio de ligações peptídicas. Os aminoácidos, por sua vez, são moléculas orgânicas que possuem ligados ao mesmo átomo de carbono (denominado de carbono α) um átomo de hidrogênio, um grupo amina, um grupo carboxílico e uma cadeia lateral “R”, característica para cada aminoácido. Essa cadeia lateral é o que difere os aminoácidos em sua estrutura, tamanho, cargas elétricas e solubilidade em água. Além de conferir propriedades físico-químicas diferentes a cada aminoácido, as cadeias laterais são também responsáveis por forças estabilizadoras (interações fracas do tipo ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, eletrostáticas, etc.) que mantêm as estruturas conformacionais enoveladas das proteínas (NELSON; COX, 2011).

A variação no número e na sequência desses aminoácidos permite que haja um grande número de proteínas com diferentes funções. No caso das enzimas, o número de

aminoácidos componentes de sua cadeia e a ordem em que eles se encontram, vão determinar a sua estrutura e conseqüentemente a forma de interação no meio reativo. Atualmente estima-se que das 25000 enzimas presentes na natureza, cerca de 2800 foram classificadas e perto de 400 são comercializadas na forma pura (JOÃO; ZANELLA, 2000).

Na classificação das enzimas, o nome da mesma não especifica a sua estrutura, mas contrariamente, define a principal reação catalisada e, por isso, as enzimas são classificadas em seis classes diferentes, cada uma com subclasses, com base nos tipos de reações que catalisam, a saber: oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (NELSON; COX, 2011).

A cada enzima é atribuído um número classificatório de quatro dígitos, que identifica o tipo de reação catalisada por ela. Por exemplo, a enzima lipase, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), é classificada como triacilglicerol hidrolase, EC 3.1.1.3, onde EC significa *Enzyme Commission*, o primeiro dígito (3) refere-se ao nome da classe (hidrolase); o segundo dígito (1) refere-se à subclasse (atua sobre ligações éster); o terceiro dígito (1) refere-se à sub-subclasse (carboxil éster hidrolase); e o quarto dígito (3) é o número de série dentro da sub-classe e significa que a enzima atua sobre triacilglicerídeos (SAAD, 2005).

As enzimas têm grande importância na área de biotecnologia, sendo que a utilização desses biocatalisadores no setor industrial tem-se mostrado uma opção interessante, tanto em termos de processo como em termos ambientais.

O mercado mundial de enzimas está em franca ascensão. Segundo relatório publicado em março de 2012 pela Business Communications Company Inc. (BCC Research), o mercado global de enzimas industriais (enzimas para detergentes, papel e celulose, manufatura de couros, alimentos, bebidas, alimentação animal, etc.) foi avaliado em US\$3,6 bilhões em 2010, com uma projeção para 2016 de US\$6 bilhões. Enzimas para alimentos e bebidas compreendem o maior segmento das enzimas industriais com receitas próximas a US\$1,2 bilhão em 2010 e expectativa de US\$2,1 bilhões para 2016. O segundo maior segmento são as enzimas técnicas (enzimas destinadas à indústria têxtil e de produtos de limpeza), com receitas de aproximadamente US\$1,1 bilhão em 2010 e expectativa de US\$1,7 bilhão para 2016.

2.2 Lipases

Lipases (triacilglicerol ester hidrolases, EC 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interfase orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de óleos e gorduras com a liberação de ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Em meios com baixa concentração de água, as lipases catalisam reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (MENDES et al., 2012). Essa versatilidade das lipases permite que estas enzimas sejam empregadas em diversos setores da indústria (Quadro 1) na formulação de detergentes, produção de fármacos, cosméticos, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias e modificações de óleos e gorduras (SHARMA; CHIST; BANERJEE, 2001).

Quadro 1 – Aplicações industriais da lipases.

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

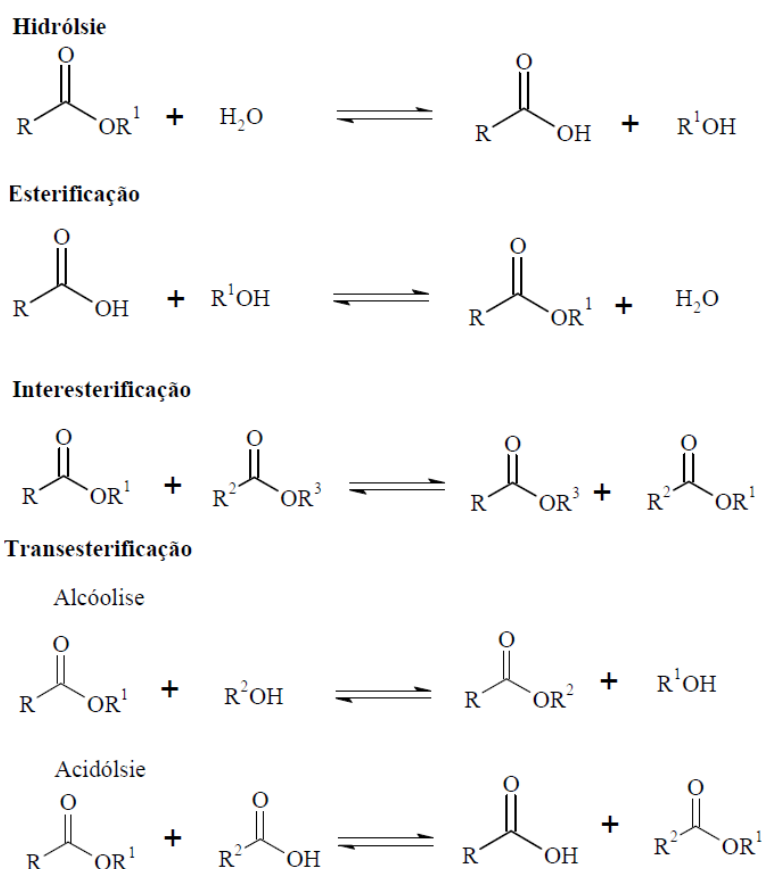
Fonte: Sharma; Chist; Banerjee, 2001.

2.2.1 Reações catalisadas por lipases

Conforme dito anteriormente, as lipases além de promoverem a hidrólise de óleos e gorduras também são capazes de catalisar reações reversas, como por exemplo, a formação de ésteres, a partir de um álcool e ácido carboxílico com liberação de água, em um processo denominado esterificação (PAQUES; MACEDO, 2006). Esses processos de

hidrólise e esterificação podem ser combinados numa sequência resultando em reações denominadas de transesterificação (Figura 1), que dependo dos reagentes de partida, podem ser acidólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um ácido carboxílico), alcoólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um álcool) e interesterificação (quando dois grupos acila são deslocados entre dois ésteres), sem ocorrer nem consumo nem formação de água (CARVALHO et al. 2003; CASTRO et al., 2004).

Figura 1 - Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipase.



Fonte: Adaptado de Paques; Macedo, 2006.

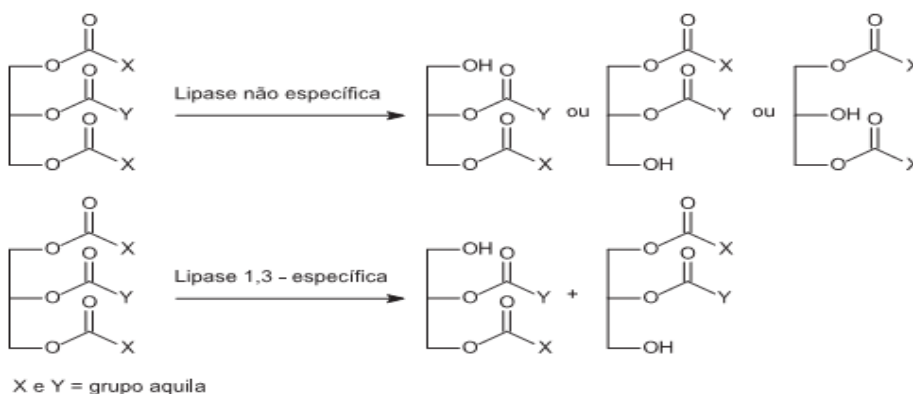
2.2.2 Especificidade das lipases

Muitas vezes, as lipases são confundidas com esterases (EC 3.1.1.3), que possuem uma atividade restrita à hidrólise de substratos hidrossolúveis e de cadeia carbônica curta, enquanto lipases exibem elevada atividade na hidrólise de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa e de baixa solubilidade em água (FORJAN et al., 2000). A especificidade

preferencial das duas enzimas ao substrato também é empregada como parâmetro para a diferenciação entre lipase e esterases.

As lipases podem ser classificadas em grupos de acordo com sua especificidade; o primeiro grupo (Figura 2) refere-se às regiosseletivas, as quais são subdivididas em: (A) lipases não específicas – hidrolisam moléculas de triacilgliceróis, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários (CASTRO et al., 2004); (B) lipases 1,3 específicas – catalisam apenas os ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis; (C) ácidos graxos específicos que atuam no carbono de número nove. O segundo grupo refere-se à especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, no qual a lipase é específica ao comprimento da cadeia ou à presença da dupla ligação na cadeia do resíduo de ácido graxo (CASTRO, 2004).

Figura 2 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica.



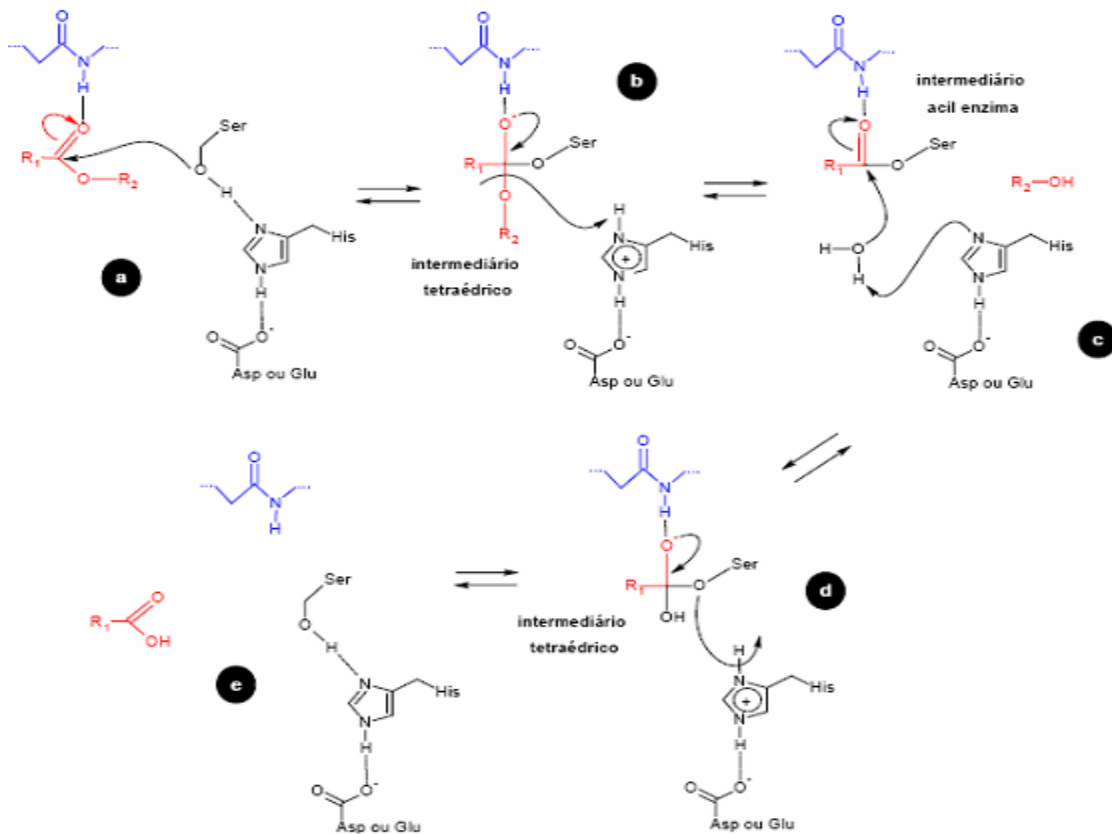
Fonte: Paques; Macedo, 2006.

2.2.3 Mecanismo de reação das lipases

As lipases são enzimas que apresentam um mecanismo peculiar de atuação; o seu sítio ativo é geralmente caracterizado pela tríade composta dos aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp), complexos acil-enzima sendo intermediários cruciais em todas as reações catalisadas por lipases (JAEGER; REETZ, 1998; SAAD, 2005). Devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo de lipases e proteases, o mecanismo catalítico para lipase segue o modelo proposto para a quimotripsina, uma serina protease. O mecanismo (Figura 3) é composto por cinco etapas. Inicialmente, a histidina aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio catalítico através de uma ligação de hidrogênio (a). Então, o grupo hidroxila da serina age como uma base atacando o carbono suscetível da ligação éster, abrindo a ligação C=O, dando origem ao intermediário tetraédrico (b), que é

estabilizado por ligações de hidrogênio formadas com as ligações amida. Nesta fase, a histidina atrai o hidrogênio liberado pela serina e o aspartato ou o glutamato estabilizam a carga positiva que se forma na histidina (JAERGER et al., 1999; REIS et al., 2009).

Figura 3 - Mecanismo catalítico da lipase. (a) ataque nucleofílico da hidroxila da serina ao carbono suscetível da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil enzima e ataque nucleofílico da água; (d) intermediário tetraédrico; (e) enzima livre.



Fonte: Adaptado de JAERGER et al., 1994.

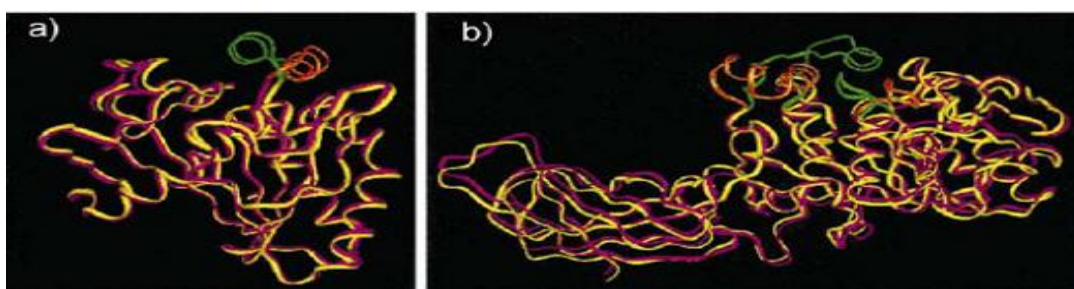
Após a sua estabilização o intermediário tetraédrico é desfeito pelo retorno da ligação C=O e consequente clivagem da ligação éster liberando assim um álcool, cujo oxigênio recebe um próton proveniente da histidina, formando-se assim um complexo acil enzima (c). Esse complexo tem o seu carbono suscetível atacado pelo íon hidroxila da água abrindo assim a ligação C=O, formando um segundo intermediário (d). Por fim, o retorno da ligação C=O desfaz o intermediário tetraédrico, ocorrendo assim a liberação do ácido carboxílico e da enzima livre (e). (JAERGER et al., 1999; REIS et al. 2009).

2.2.4 Estrutura das lipases

Por serem obtidas a partir de diferentes fontes, as lipases podem variar amplamente quanto a massa molecular (9,4 a 195 kDa) e ao pH (4,5 a 11) e temperatura (25 a 80°C) de máxima atividade catalítica. Os apêndices e anexos 1 e 2 resumem os dados dessas propriedades compilados a partir de diversas referências bibliográficas.

A determinação da estrutura da lipase foi estudada através de técnicas de cristalografia realizadas na presença de meios aquosos homogêneos, revelando que o sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as lipases, sendo esta tríade frequentemente protegida na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “*lid*”, e devido à presença do *lid*, a lipase pode se apresentar em duas diferentes conformações (Figura 4) (BRADY et al., 1990; REIS et al., 2009). Na primeira conformação o sítio ativo da enzima está fechado pela tampa polipeptídica que isola o sítio ativo do meio de reação (nesta conformação a lipase é considerada inativa). Na segunda conformação, a enzima torna-se ativa em contato com uma interface hidrofóbica, ocorrendo assim a abertura da tampa polipeptídica. De acordo com Paiva, Balcão e Malcata (2000) a abertura da tampa consiste em uma reestruturação conformacional da lipase que cria uma região nucleofílica (a desprotonação da serina ocasiona a formação de oxiânions, nucleófilos que atacam ligações ésteres) em torno do resíduo serina: a tampa helicoidal vira-se para trás encobrendo seu lado hidrofílico em uma cavidade polar, antes preenchida com água, e expondo totalmente o lado hidrofóbico da tampa. Essa exposição faz com que a superfície apolar em torno do sítio ativo seja expandida acomodando assim o estado de transição tetraédrico. Um exemplo de expansão durante o processo de ativação na lipase de *Rhizomucor miehei* foi relatado por Derewenda et al (1992). Segundo esses autores, a espinha dorsal da tampa foi deslocada um pouco mais que 7 Å, expandindo em aproximadamente 750 Å² a área hidrofóbica da superfície da enzima.

Figura 4 - Superposição dos esqueletos das lipases de *Rhizomucor miehei* (a) e de pâncreas humano (b), mostrando a mudança conformacional da tampa da enzima. A tampa está destacada em verde.



Fonte: BRADY et al., 1990.

2.2.5. Fontes vegetais de lipases

Lipases podem ser obtidas de tecidos de vários vegetais e animais ou produzidas por fermentação de várias espécies de microrganismos (bactérias e fungos). Em eucariotos, as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo, incluindo digestão de gorduras, absorção, reconstituição e metabolismo de lipoproteínas (SHARMA; CHIST; BANERJEE, 2001). Nas plantas são encontradas em tecidos de reserva de energia. As sementes oleaginosas usam esta enzima durante os primeiros estágios da germinação, iniciando a metabolização de triglicerídeos estocados através de hidrólise dos ácidos graxos (QUETTIER; EASTMOND, 2009). Os ácidos graxos liberados são levados às vias de produção de energia, fornecendo assim energia para o crescimento do embrião.

As lipases vegetais têm sido caracterizadas e aplicadas em reações de biotransformação. De acordo com Pahoja e Sethar (2002) a atividade hidrolítica foi identificada em vários tecidos de plantas, no entanto concentrações relativamente elevadas foram encontradas apenas em sementes.

Sementes são o principal local de armazenamento das substâncias de reserva (fonte compacta de energia necessária para as funções vitais e para o desenvolvimento da semente na fase de germinação). As principais substâncias de reservas armazenadas pelas sementes durante o seu desenvolvimento são os carboidratos, lipídeos e proteínas. Além disso, encontram-se ainda enzimas como invertases, amilases, lipases, proteinases, alfa-galactosidases, e outras, responsáveis pela conversão das macromoléculas (reservas) em metabolizáveis (amido em glicose, triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos, e polipeptídios em peptídeos menores ou diretamente em aminoácidos), que serão transferidas aos pontos de crescimento durante a germinação das sementes (MARTINS et al., 2007; QUETTIER; EASTMOND, 2009).

2.2.5.1 Germinação

Wang, Lin e Huang (1984) verificaram que a quantidade de lipase nas plantas de milho jovem de diferentes variedades foi proporcional à quantidade de triacilglicerol nelas armazenada, mostrando que a lipase esta intimamente ligada ao lipídeo, tanto fisicamente quanto metabolicamente e ainda que a lipase é sintetizada na proporção metabólica necessária.

O efeito da germinação na composição química e aspectos nutricionais variam de acordo com as espécies de vegetais e as condições de germinação das sementes. A germinação consiste na retomada do desenvolvimento que havia sido interrompido por ocasião da maturidade fisiológica, e com isso a taxa de respiração aumenta (NEDEL, 2003).

Organismos armazenam o excesso de energia podendo liberá-lo quando eles sofrem de privação de energia, sendo que para a maioria dos eucariontes os compostos de armazenamento preferido são lipídeos na forma de triacilgliceróis, já que a oxidação completa de um lipídeo produz duas vezes mais energia que a oxidação de proteínas ou hidrólise de carboidratos (MURPHY, 2001; QUETTIER; EASTMOND, 2009). Nas plantas o principal local de armazenamento do triacilglicerol é no embrião. A maior parte da atividade da lipase também é encontrada nesses tecidos (URQUHART et al. 1984; SUZUKI; HONDA; MUKASA, 2004).

Durante a germinação ocorre a degradação do triacilglicerol presente na semente e esta degradação proporciona uma fonte de carbono que irá abastecer o crescimento da planta e permitir que ele se torne uma muda fotossinteticamente ativa com um sistema de raízes e folhas (cotilédones). Resumidamente, o processo consiste da hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos e gliceróis pela ação da lipase, e posteriormente tanto o glicerol quanto o ácido graxo sofrem reações biológicas até serem convertidos em açúcares que irão sustentar o crescimento do embrião durante a germinação (GRAHAM, 2008; QUETTIER; EASTMOND, 2009). Os ácidos graxos são ativados a acil-CoA e depois convertidos para açúcares, entretanto, segundo Hills, Murphy e Beevers (1989) o composto acil-CoA atua como um inibidor natural da lipase, ou seja, a ação da lipase provoca um aumento na concentração dos ácidos graxos e por sua vez aumento na concentração de acil-CoA, provocando a inibição da lipase.

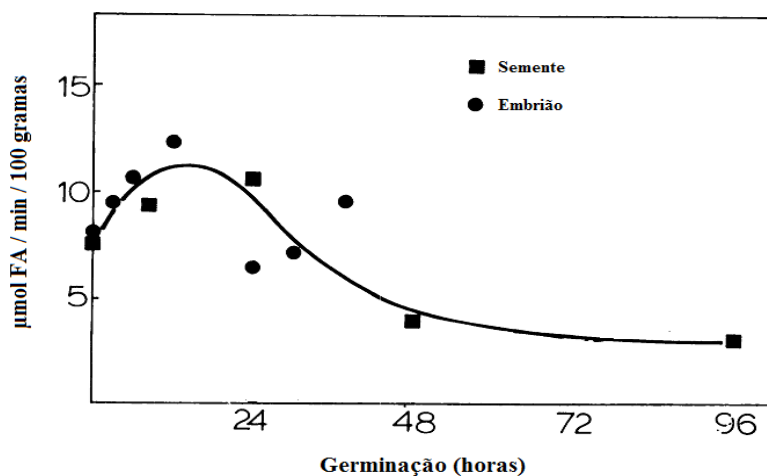
A variação da atividade enzimática durante a germinação nos grãos de três diferentes cultivares de aveia foi estudada por Urquhart et al. (1984) (Figura 5). Os autores observaram um aumento de 60% na atividade enzimática após 12 horas de germinação, porém a partir de 24 horas os valores de atividade eram inferiores, e ainda após 48 horas os valores de atividade observados eram inferiores aos valores encontrados no grão não germinado. Janecke (1951)¹ citada por Urquhart et al. (1984) também observou um comportamento semelhante, o máximo de atividade ocorreu após 8 horas do início da germinação seguida por

¹ JANECKE, H. Über die Haferlipase. v.3, p.29-34, 1951.

uma diminuição, e após três dias de germinação os níveis de atividade encontrados foram ligeiramente inferiores aos dos grãos não germinados.

Portanto, pelo aumento na atividade enzimática de lipases extraídas de diferentes sementes germinadas, a germinação torna-se um parâmetro de significativa importância, proporcionando um ganho de atividade significativo ao final do processo de extração da lipase.

Figura 5 - Atividade em função do tempo de germinação.



Fonte: Adaptado de Urquhart et al. (1984).

Urquhart et al. (1984) estudaram também o efeito da maturação dos grãos na atividade da lipase presente nas três diferentes cultivares de aveia analisadas. Nas três cultivares analisadas, os picos de atividade enzimática ocorreram entre 23 e 30 dias após o florescimento, quando os grãos já tinham atingido a sua maturidade fisiológica. Outra observação feita foi que a lipase ainda estava presente nos grãos mesmo após a colheita, embora em níveis muito reduzidos. Segundo os autores, a diminuição da atividade era causada pela perda de umidade, que promovia inativação da enzima por desnaturação.

2.2.5.2 Extração de lipases vegetais

A extração é uma etapa preliminar à purificação, sendo o seu objetivo a obtenção de um extrato bruto contendo a enzima na forma solúvel.

O método de separação de proteínas baseado nas diferenças de solubilidade está entre os processos mais utilizados nas fases iniciais da purificação. Neste método, os sais

têm efeitos na solubilidade das proteínas, podendo tanto aumentar quanto diminuir a solubilidade da proteína na solução. Em concentrações reduzidas, os sais aumentam a solubilidade de muitas proteínas (“salting-in”, efeito ocasionado por alterações na tendência à ionização dos grupos R dissociáveis da proteína), enquanto em concentrações elevadas, a solubilidade da proteína é reduzida (“salting-out”, a hidratação dos íons do sal reduz a disponibilidade de moléculas de água que circundam as regiões hidrofóbicas da superfície da proteína, ocorrendo a sua precipitação). A capacidade desses sais de influenciar a solubilidade das proteínas é uma função de sua força iônica, que depende tanto da sua concentração como do número de cargas elétricas dos cátions e ânions que formam o sal. Entretanto, o efeito do aumento ou da redução da força iônica na solubilidade pode ser diferente para cada tipo de proteína (LEHNINGER, 1976).

Para lipase de origem vegetal, o método de extração também se baseia na solubilidade do soluto (semente, flor, folha e etc.) com o solvente (tampão). De acordo com Copabiango et al. (2006), diferentes procedimentos utilizando solventes para extrair as proteínas dos cereais são relatados na literatura, nos quais fatores como concentração e tipo de solvente, temperatura e tempo da extração variam com o intuito de aumentar a eficiência do processo. A Tabela 1 apresenta estes e outros fatores nas extrações de diferentes lipases obtidas a partir de diferentes vegetais.

Observando a Tabela 1 é possível notar que os sais mais usados nos solventes de extração são o Tris-HCl e também o fosfato de sódio (ambos em concentrações reduzidas), o pH mais usado na extração varia de 7 a 8, o tempo de extração varia de 30 min a 12 h, a temperatura mais usada é de 4°C e por fim a relação solvente/soluto varia de 1 a 10 (v/m).

Tabela 1 – Extração de lipases a partir de diferentes vegetais.

| Espécie | R. | Solvente | pH | t (h) | T (°C) | [mL_{solvente}/g_{semente}] | Referência |
|---|-----------|--|-----------|--------------|---------------|--|---|
| Farelo de arroz <i>(Oryza sativa)</i> | Sim | Tampão Tris-HCl 100 mM | 7,5 | 12 | 4 | - | BHARDWAJ; RAJU; RAJASEKHARAN, 2001 |
| Semente de noqueira <i>(Juglans regia L.)</i> | Sim | Tampão fosfato de sódio (100 mM) | 7,0 | NT | 4 | 7,0 | YEŞILOĞLU; DEMIRKAN, 2010 |
| Semente de girassol <i>(Helianthus annuus L.)</i> | Sim | Tampão fosfato de sódio (50 mM com 0,5 mM de CaCl ₂) | 7,0 | NT | 4 | 4,0 | SAGIROGLO, A.; ARABACI, N. 2005 |
| Semente de Vernonia <i>galamensis</i> | Não | Tampão Tris-HCl (150 mM, com 0,4 M sacarose, 2 mM EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) e 0,5 mM DTT (Ditiotreitol)) | 7,5 | - | - | 4,0 | NCUBE, I. et al., 1995 |
| Semente de Jatropha curcas <i>L.</i> | Não | Tampão tricina (150 mM com 0,6 M Sacarose, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl ₂ e 2 mM DTT) | 7,5 | - | 4 | 4 | ABIGOR, R. D. et al., 2002 |
| Germe de Trigo <i>(Triticum aestivum L.)</i> | Sim | Vários tampões foram testados, mas o melhor resultado foi obtido com o tampão Tris-HCl (50 mM com 8 mM β-mercaptoetanol e 2 mM EDTA) | - | - | 4 | 10 | KAPRANCHIKOV; ZHEREBTSOV; POPOVA, 2004 |

Tabela 1 – Extração de lipases a partir de diferentes vegetais (Continuação).

| Espécie | R. | Solvente | pH | t (h) | T (°C) | [mL_{solvente}/g_{semente}] | Referência |
|--|-----------|---|-----------|--------------|---------------|--|------------------------------------|
| Semente de trigo <i>(Fagopyrum esculentum)</i> | Não | Tampão acetato-NaOH (50 mM com 1 mM EDTA) | 5,0 | 2 | - | 10 | SUZUKI; HONDA; MUKASA, 2004 |
| Semente de mamona chinesa (várias variedades) | Sim | Tampão Tris-HCl (165 mM com 0,4 M sacarose, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl ₂ e 2 mM DTT) | 7,5 | - | - | - | ER-ZHENG, S. et al., 2010 |
| Flor de trigo | Sim | Tampão Tris-HCl (100 mM com 1 mM acetato de cálcio) | 7,4 | - | 4 | - | TANI; OHISHI; WATANABE, 1994 |
| Semente de <i>Brassica napus</i> <i>L.</i> | Sim | Tampão fosfato de sódio (5 mM) | 7,0 | - | 4 | - | SANA, N. K. et al., 2004 |
| Semente de <i>Pachira</i> <i>aquatica</i> (Bombacaceae) | Não | Tampão Tris-HCl (50 mM com 10 mM EDTA e 10 mM metabissulfito de sódio) | 8,0 | - | 25 | - | POLIZELLI, P. P. 2008 |
| Não informado | Não | Tampão Tris-HCl (50 mM) | 8,0 | - | - | 2-5 | HELLYER; CHANDLER; BOSLEY, 1999 |
| Semente de trigo <i>(Avena sativa L.)</i> | Não | Tampão Tris-HCl (50 mM com 1% triton X-100, 0,2% benzeno) | 7,5 | - | - | - | URQUHART, A. A. et al., 1984 |

Tabela 1 – Extração de lipases a partir de diferentes vegetais (Continuação).

| Espécie | R. | Solvente | pH | t (h) | T (°C) | [mL_{solvente}/g_{semente}] | Referência |
|--|-----------|--|-----------|--------------|------------------|--|-----------------------------------|
| Farelo de Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | Sim | Tampão fosfato de potássio (50 mM com 0,5 mM CaCl ₂) | 7,0 | ½ | 10 | - | KIM, H. Y. 2004 |
| Semente de <i>Hevea brasiliensis</i> | Não | Tampão fosfato (0,1 M) | 8,0 | - | T _{amb} | 1 | WEERASOORIYA; GUNASEKARA, 2011 |
| Semente de <i>Laurus nobilis</i> L. | Sim | Tampão – Fosfato (100 mM) | 7,0 | 1 | T _{amb} | - | ISBILIR; OZCAN; YAGAR, 2008 |
| Farelo de Arroz (várias variedades) | Sim | Tampão fosfato (50 mM com 0,5 mM de CaCl ₂) | 7,0 | 1/2 | 10 | - | PRABHU, A. V. et al., 1999 |

t - Tempo de extração em horas.

T - Temperatura de extração em °C.

R. - Ressecamento do grão quanto à presença de óleo.

[mL_{solvente}/g_{semente}] - Relação de mililitro de solvente por grama de semente, usada para a extração.

NT - Noite toda.

T_{amb} – Temperatura ambiente.

2.2.5.3 Purificação de lipases

De modo geral, o número de etapas empregadas no processo de purificação é dependente da purificação desejada e também do uso a que se refere o produto final. Durante o processo de purificação, perde-se atividade em cada etapa, por isso, para aumentar o rendimento, um número mínimo de etapas deve ser efetuado. Portanto, as escolhas das técnicas a serem empregadas devem estar vinculadas às propriedades inerentes a cada enzima (LIMA et al., 2001).

A purificação de lipases tem, em geral, dois objetivos básicos: (a) obtenção da enzima pura, para melhor estudo de suas características bioquímicas e de sua estrutura e (b) obtenção de um produto com maior atividade específica para aplicação em diversos processos (PALEKAR; VASUDEVAN; YAN, 2000; KOBLITZ; PASTORE, 2004).

Lipases têm sido purificadas por diferentes processos que podem envolver o uso de métodos como: filtração, precipitação, cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, cromatografia de interações hidrofóbicas e cromatografia por afinidade (SAXENA et al., 2003). Nas fases iniciais, são muito utilizadas operações unitárias como a filtração, a precipitação por sais ou mesmo por solvente, para a eliminação de impurezas grosseiras. No entanto, esses métodos apresentam uma baixa capacidade de resolução, sendo então necessárias etapas complementares usando métodos com maior capacidade de resolução, como os métodos cromatográficos (LEHNINGER, 1976). A Tabela 2 apresenta de forma resumida o procedimento de purificação de lipase adotado por vários autores para diferentes lipases vegetais, bem como o substrato adotado para análises de atividade. Nessa tabela também são apresentados os fatores de purificação e o rendimento de purificação de cada trabalho.

A partir da Tabela 2 observa-se que a precipitação com sulfato de amônio foi utilizada em cerca de 70% dos trabalhos analisados, sendo o sal responsável pela precipitação das proteínas presentes no extrato bruto. Após a solubilização desse precipitado, em aproximadamente 50% dos trabalhos foi realizada uma diálise como etapa preparatória para a última etapa do processo de purificação, onde foram utilizados métodos de alta resolução de separação, como a cromatografia e a ultrafiltração.

Tabela 2 – Purificação de lipases a partir de diferentes vegetais.

| Espécie | A _E (U/mg) | Substrato | Sistema de purificação adotado | RP | FP | Referência |
|--|-----------------------|----------------------------|---|-------|------|---|
| Farelo de arroz (<i>Oryza sativa</i>) | 0,38 | 2-Palmitoil e Trioleína | Filtração com gases, centrifugação e cromatografia em coluna de octil-Sepharose | 22,80 | 7,6 | BHARDWAJ; RAJU; RAJASEKHARAN, 2001 |
| Semente de noqueira (<i>Juglans regia L.</i>) | 180,2 | Azeite de oliva | Precipitação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia em coluna Sephadex G-100 | 31,00 | 28,6 | YEŞILOĞLU; DEMIRKAN, 2010 |
| Semente de girassol (<i>Helianthus annuus L.</i>) | 555 | Azeite de oliva | Precipitação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia em coluna Sephadex G-75 | - | 603 | SAGIROGLO; ARABACI, 2005 |
| Semente de Vernonia <i>galamensis</i> | 11905 | - | Centrifugação e cromatografia em coluna Sephacryl S-300. | 28,00 | 73 | NCUBE et al., 1995 |
| Germe de trigo (<i>Triticum aestivum L.</i>) | 0,62 | Azeite de oliva | Precipitação isoelétrica, filtração em gel (Sephadex G-25), cromatografia de troca iônica (DEAE-CELULOSE) e por fim cromatografia em gel (Sephadex G-150) | 4,40 | 61,1 | KAPRANCHIKOV; ZHEREBTSOV; PO POVA, 2004 |
| Semente de trigo (<i>Fagopyrum esculentum</i>) (Lipase I) | 0,360 | p-Nitrofenil Laurato | Precipitação com sulfato de amônio, diálise, coluna DEAE - Sepharose e por fim uma nova cromatografia usando uma coluna Sephacryl S-200. | 1,70 | 60,2 | SUZUKI; HONDA; MUKASA, 2004 |
| Semente de trigo (Lipase II) | 0,858 | p-Nitrofenil Laurato | Precipitação com sulfato de amônio, diálise, coluna DEAE - Sepharose e por fim uma nova cromatografia usando uma coluna Sephacryl S-200. | 2,30 | 143 | SUZUKI; HONDA; MUKASA, 2004 |

Tabela 2 – Purificação de lipases a partir de diferentes vegetais (Continuação).

| Espécie | A_E (U/mg) | Substrato | Sistema de purificação adotado | RP | FP | Referência |
|---|-----------------------------|--------------------|---|-----------|-----------|-----------------------------------|
| Sementes de mamona Chinesa (várias variedades) | 324,2 | Azeite de oliva | Precipitação, cromatografia em coluna DEAE-Sepharose Cl-6B e por fim em coluna Butyl-Sepharose CL-4B | 17,70 | 16,1 | ER-ZHENG et al., 2010 |
| Semente de <i>Pachira aquatica</i> (Bombacaceae) | 614,3 | - | Eletroforese (13% de poliacrilamida) | 7,00 | 9,6 | POLIZELLI, 2008 |
| Semente de <i>Brassica Napus L.</i> | 366,54 | Azeite de oliva | Precipitação com sulfato de amônio, diálise, liofilização, cromatografia usando uma coluna Sephadex G-50, depois uma coluna DEAE - Sepharose e por fim uma coluna de carboximetil celulose (CM – CELULOSE). | 24,60 | 67,6 | SANA et al., 2004 |
| Semente de <i>H. Brasiliensis</i> | 2,43 | Óleo vegetal | Precipitação com sulfato de amônio, diálise, e por fim uma cromatografia de troca iônica usando uma coluna de dietilaminoetil - celulose (DEAE-CELULOSE) | 62,14 | 7,6 | WEERASOORIYA; GUNASEKARA, 2011 |
| Farelo de Arroz (várias variedades) | 0,0153 | Tributirina | Centrifugação, ultrafiltração em membrana de 100 kDa e ultrafiltração em membrana de 10 kDa. | 80,24 | 2,0 | PRABHU et al., 1999 |

AE – Atividade específica no final da purificação

RP – Rendimento da purificação (%).

FP – Fator de purificação – relação entre as atividades específicas antes e após o processo de purificação.

2.3 Imobilização enzimática

A utilização de enzimas na indústria cresceu sensivelmente nos últimos anos devido às vantagens frente aos catalisadores químicos, dentre as quais se destacam, elevada atividade catalítica, especificidade por determinado substrato e elevada atividade em condições brandas de temperatura e pressão (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). No entanto, o seu uso na indústria pode ser limitado devido à sua relativa instabilidade em solução, custos elevados de isolamentos e purificação e à dificuldade de recuperação da enzima ativa após o término do processo catalítico.

Este inconveniente pode ser minimizado pelo uso de técnicas de imobilização, tornando as enzimas mais estáveis cataliticamente e simplificando as etapas de recuperação do produto. A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação covalente da enzima a um material insolúvel, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação em uma membrana polimérica (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO et al. 2007; SECUNDO et al. 2008).

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como as características de regeneração e inativação, custo do procedimento, e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (MALCATA et al., 1990). Outro parâmetro importante a ser considerado na seleção do método de imobilização é o suporte. Para ser efetivo na imobilização o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado no final do processo, sem que ocorram perdas na atividade (MATEO et al. 2007).

A natureza do suporte é muito importante para a eficiência da imobilização e as principais características a serem observadas na seleção de um suporte para determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiológico, resistência mecânica, resistência à compactação em operações em altas vazões quando se utiliza reatores de leito fixo, custo e outras (VILLENEUVE et al. 2000; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO et al. 2007). A Figura 6 apresenta um esquema com os principais tipos de suporte utilizados para imobilização.

As enzimas imobilizadas estão sempre competindo com as enzimas nativas. A escolha por um determinado catalisador imobilizado vai depender do quanto as suas propriedades melhoram quando comparadas com a forma nativa, ou seja, se a imobilização da

enzima reduz custos ou eventuais danos ambientais. Portanto, a decisão mais adequada para o uso de determinado tipo de enzima (imobilizada ou nativa) deve ser efetuada após uma análise cuidadosa da situação (ZANIN; MORAES, 2004).

Figura 6 - Classificação dos suportes para a imobilização de enzimas.



Fonte: ZANIN; MORAES, 2004.

O método de imobilização por adsorção física é uma técnica bastante simples, tornando-o um dos mais amplamente usados na imobilização de enzimas. Neste procedimento a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras (VILLENUEVE et al. 2000; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Algumas vantagens apresentadas pela imobilização por adsorção são a sua simplicidade de execução, menor custo e também a pequena interferência na estrutura nativa da enzima, e por isso, geralmente não promove perda de atividade enzimática. O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como, tamanho da proteína adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, porosidade e tamanho dos poros (VILLENUEVE et al., 2000).

2.4 Imobilização de lipases

Dentre os métodos de imobilização disponíveis, a adsorção ainda é o mais utilizado para a imobilização de lipases, devido à grande porção hidrofóbica da proteína, facilidade de preparação, menor custo e menor agressividade em relação à perda de atividade enzimática (SECUNDO et al., 2008; BARON, 2008). Dentre os diferentes suportes disponíveis, a sílica se mostra como um suporte interessante para a imobilização de lipases, pois além da sua natureza inorgânica, o que dispensa preocupação com contaminação microbiana, é mecanicamente resistente e pode ser facilmente funcionalizada com diferentes grupos reativos.

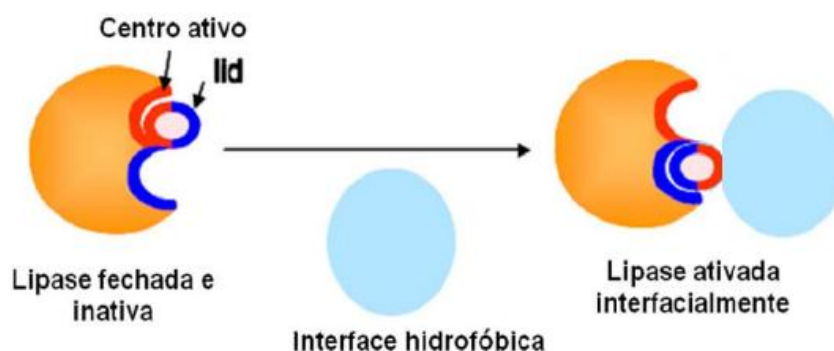
A adsorção interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos foi proposta por Palomo et al. (2002) como um método simples para se preparar derivados de lipases úteis em todos os meios. A ideia do método é usar a afinidade da enzima por interfaces hidrofóbicas como uma estratégia de imobilização. Usando-se suportes altamente hidrofóbicos, que se assemelham de algum modo às superfícies de gotas dos substratos naturais das lipases, e força iônica muito baixa, as lipases tornam-se seletivamente imobilizadas nestes suportes (BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2002; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2008, CABRERA et al., 2009). Outras proteínas solúveis em água não são adsorvidas ao suporte sob as suaves condições usadas, favorecendo somente a adsorção da lipase (BASTIDA et al., 1998). Portanto, pode-se obter em uma única etapa a imobilização, a estabilização e a purificação da preparação enzimática.

A adsorção interfacial envolve as áreas hidrofóbicas que circundam o sítio ativo (Figura 7) e a face interna da tampa (BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2002; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2008, CABRERA et al., 2009). Lipases imobilizadas por adsorção interfacial apresentam-se na forma aberta (ativa), com o sítio ativo acessível a substratos pequenos, independente da presença de interfaces hidrofóbicas externas (VERGER et al., 1997; BASTIDA et al., 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2008, CABRERA et al., 2009). De fato, Bastida et al. (1998) e Palomo et al. (2002) observaram que lipases imobilizadas por adsorção interfacial a suportes altamente hidrofóbicos, tais como, octadecil-sephabeads, phenil-sepharose e octil-agarose, exibiam atividade significativamente realçada (efeito este conhecido como hiperativação).

De acordo com Baron (2008), nos últimos anos as pesquisas sobre imobilização de lipase vêm sendo reportadas em duas vertentes. A primeira diz respeito a

estudos realizados visando a utilização de novos materiais para imobilização destas enzimas, como nano fibras de polianilina magnética, membranas de algodão, dentre outros. Na segunda, estão os estudos realizados com enzimas imobilizadas (normalmente comerciais), visando altos rendimentos de reação, resolução de misturas racêmicas, e reutilização da enzima em reações diversas, em especial na síntese de biodiesel e ésteres.

Figura 7 - Adsorção interfacial de lipase sobre uma superfície hidrofóbica.



Fonte: VOLPATO, 2009.

2.5 Biodiesel

Biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, provenientes de fontes vegetais ou gorduras animais, cuja utilização está associada à substituição ao diesel de petróleo. Ele é usado geralmente em motores do ciclo diesel ou para geração de outro tipo de energia que substitua parcial ou totalmente o diesel de petróleo (COSTA NETO et al., 2000). A grande compatibilidade do biodiesel com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades o torna uma alternativa capaz de atender a frota de veículos já existente sem custos de adaptação ao novo combustível, além de apresentar algumas vantagens adicionais sobre o diesel de origem fóssil, como ilustrado no Quadro 2 (COSTA NETO et al., 2000).

O uso de óleos vegetais como substituto do óleo diesel tem sido alvo de pesquisas nacionais e internacionais há muitos anos, apesar de seu uso como combustível não ser nenhuma novidade, já que no ano de 1900 em uma exposição em Paris, Rudolf Diesel apresentou um motor abastecido com óleo de amendoim (SEBRAE, 2008). No Brasil, o biodiesel saiu do estágio experimental para se transformar em um mercado promissor após ser sancionada a lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira, determinando uma mistura obrigatória de biodiesel no diesel de petróleo

e estabelecendo prazos para o cumprimento dessa adição (SEBRAE, 2008). Atualmente o percentual obrigatório de biodiesel misturado ao diesel de petróleo é de 5%.

Quadro 2 - Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial.

| Características | Propriedades Complementares |
|---|--|
| Características químicas apropriadas | Livre de enxofre e compostos aromáticos, excelente lubrificante, não tóxico e biodegradável. |
| Menos poluente | Reduz sensivelmente as emissões de partículas de carbono (fumaça), monóxido de carbono, óxidos sulfúricos e hidrocarbonetos aromáticos. |
| Tecnicamente competitivo | Complementa todas as novas tecnologias do diesel com desempenho similar e sem exigências da instalação de uma infraestrutura ou política de treinamento. |
| Regionalização | Pequenas e médias plantas para a produção de biodiesel podem ser implantadas em diferentes regiões do país, aproveitando a matéria-prima disponível em cada local. |

Fonte: Adaptado de Costa Neto et al., 2000.

A expansão do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, criado em 2005, fica comprovada quando se verifica a evolução da produção nacional de biodiesel nos últimos anos apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Produção anual de biodiesel em m³ no Brasil nos últimos anos.

| 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
|-------------|---------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 736 | 69.002 | 404.329 | 1.167.128 | 1.608.448 | 2.396.399 | 2.640.703 |

Fonte: ANP, 2011.

A produção estimada inicialmente em 1 bilhão de litros para os anos de 2008-2012 foi superada no ano de 2008, sendo ainda que em 2011 a produção nacional ultrapassou a marca dos 2,5 bilhões de litros, produção esta estimada inicialmente apenas para o ano de 2013 (2,4 bilhão de litros/ano). O sucesso do biodiesel no Brasil pode ser explicado devido ao apoio do governo com a redução de impostos, apoio às pesquisas e também à grande

disponibilidade de matéria-prima e, principalmente, a grande demanda, pois no Brasil a maior parte do transporte de mercadorias é feita através de caminhões que usam o diesel como combustível (SEBRAE, 2008).

2.5.1 Matérias-primas para a produção do biodiesel

Existem diferentes fontes de matérias-primas disponíveis para a fabricação do biodiesel. De modo geral, qualquer lipídeo de origem animal ou vegetal pode ser usado para a produção de biodiesel. Entretanto, nem todos são adequados para tal uso, pois alguns óleos e gorduras apresentam propriedades não ideais, como alta viscosidade ou alto conteúdo de iodo que são transferidos para o biodiesel e que o tornam inadequado para uso direto em motores do ciclo diesel. Além disso, fatores como disponibilidade, custo, propriedades do óleo e desempenho como combustível irão determinar qual o potencial de uso de uma dada matéria-prima na produção comercial de biodiesel (SAAD, 2005; TIOSSO, 2010).

No Brasil, a soja é a matéria-prima mais utilizada na produção do biodiesel. Devido à grande extensão territorial e condições climáticas favoráveis também podem ser encontradas uma gama considerável de diferentes fontes de matérias-primas para a produção desse bicomcombustível. Algumas espécies são de ocorrência nativa (como o babaçu, a mamona e o buriti), enquanto outras constituem culturas de ciclo curto (soja, milho, girassol, amendoim, etc.), e outras são de culturas perenes (cultura que após ser plantada e concluir o ciclo produtivo não necessita ser replantada, como por exemplo, palma, dendê e outros) (SUAREZ et al., 2009).

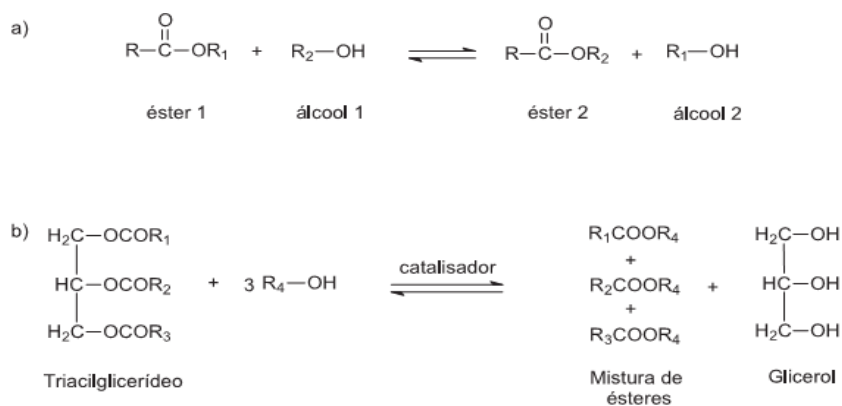
Dentre as gorduras animais com potencial para a produção de biodiesel, destacam-se os óleos de peixes, a banha de porco e por fim o sebo bovino que tem ganhado destaque, pois é uma fonte de matéria-prima que apresenta alta taxa de produção de biodiesel aliada a um baixo custo de comercialização (SUAREZ et al., 2009).

2.5.2 Processo de produção do biodiesel

Os óleos vegetais são processados de modo a adquirir propriedades semelhantes aos combustíveis fósseis, tais como viscosidade, sendo que os principais métodos empregados são o craqueamento e a transesterificação, sendo esta a tecnologia para produção industrial do biodiesel predominante no mundo (SUAREZ et al., 2009).

Transesterificação é um termo geral usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas nas quais um éster é transformado em outro através da troca do radical alcoxila (GERIS et al., 2007). Quando o éster original reage com um álcool, o processo de transesterificação é denominado alcoólise (Figura 8a). A transesterificação é o processo de separação do glicerol do óleo vegetal (Figura 8b). A remoção do glicerol através da reação de transesterificação se faz necessária para que a mistura de ésteres resultante (biodiesel) deste processo possa ser utilizada como combustível em motores a diesel, pois é o glicerol que torna o óleo mais denso e viscoso, já que cerca de 20% de uma molécula de óleo vegetal é formada por glicerol (SEBRAE, 2008).

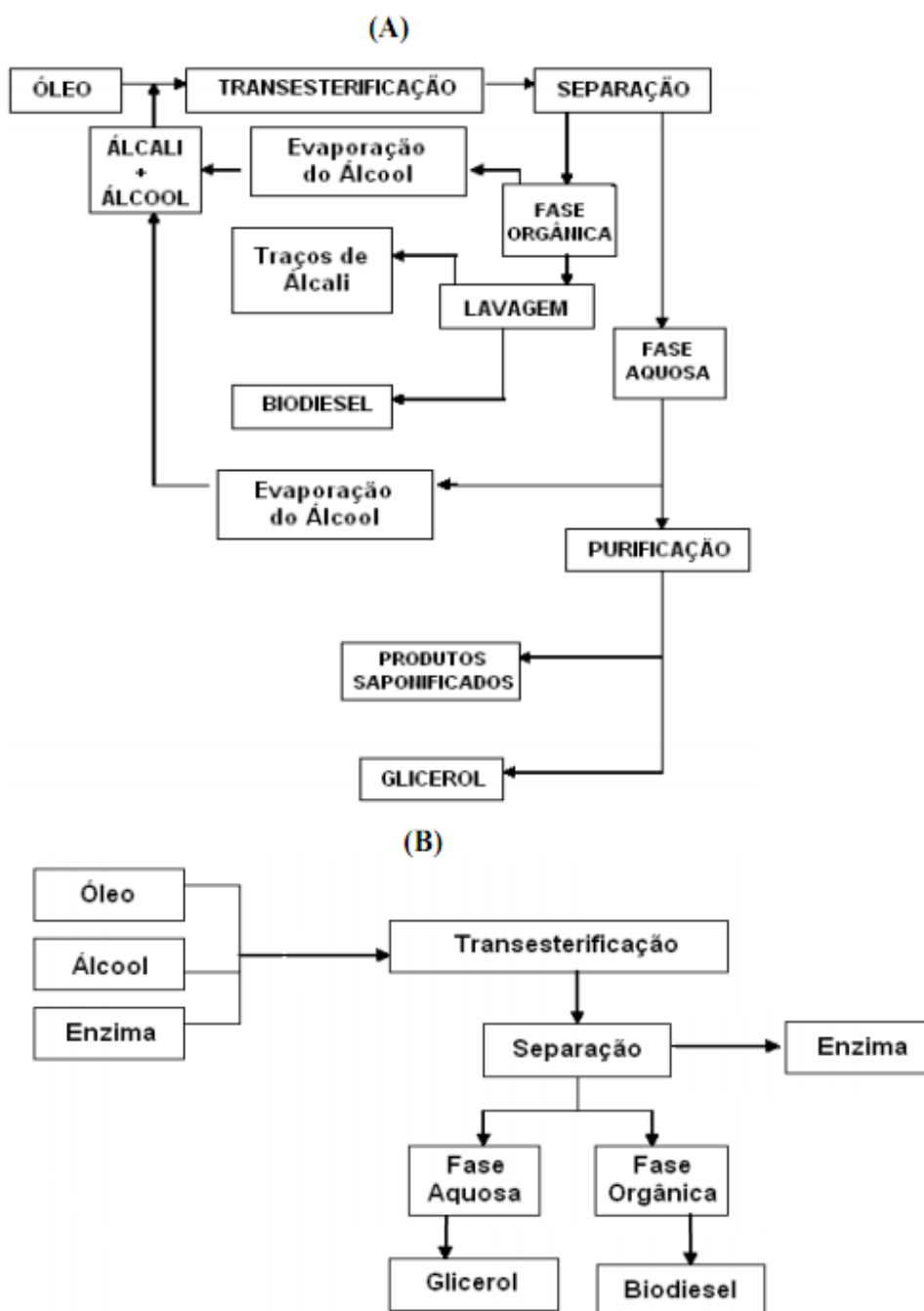
Figura 8 - Reação de alcoólise e transesterificação.



Fonte: Geris et al., (2007).

As reações de transesterificações podem ser realizadas empregando-se diferentes catalisadores. Entretanto, para a produção do biodiesel apenas o processo alcalino é realizado em escala industrial, devido a sua maior viabilidade econômica. Por outro lado, a rota de produção de biodiesel pela transesterificação química apresenta algumas desvantagens como: difícil separação dos produtos, substratos e também catalisadores envolvidos no processo, necessitando-se de repetidas lavagens para se atingir o grau de pureza necessário, além da formação de sabão na presença de água e ácido graxo livre. Por outro lado, reações de transesterificação catalisadas por enzimas imobilizadas são mais simples, como pode ser verificado na Figura 9 (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008).

Figura 9 - Produção de biodiesel por transesterificação alcalina (A) e enzimática (B) de óleos e gorduras.



Fonte: Adaptado de RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, (2008).

No quadro 3 são apresentadas as vantagens e desvantagens dos catalisadores químicos e enzimáticos.

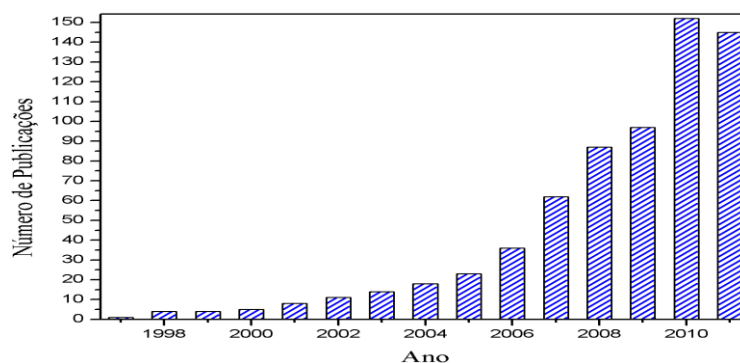
Quadro 3 - Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção do biodiesel.

| Processos | Vantagens | Desvantagens |
|------------|--|---|
| Químico | <ul style="list-style-type: none"> • Simplicidade • Alto rendimento • Curto tempo de reação | <ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade de separação do catalisador • Impossibilidade de reutilização do catalisador • Dificuldade de utilização de etanol hidratado • Obtenção de produtos com menor grau de pureza |
| Enzimático | <ul style="list-style-type: none"> • Facilidade de separação do catalisador • Obtenção de produtos mais puros • Permite o uso de etanol hidratado na reação | <ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo de reação • Custo das enzimas |

Fonte: SAAD, 2008.

A busca por um processo de produção de biodiesel mais barato e eficiente têm despertado grande interesse da comunidade científica, especialmente na utilização de lipases na produção do biocombustível. Para quantificar tal interesse foi realizado em fevereiro de 2012 um levantamento no site Web of Science sobre o número de publicações envolvendo nos últimos anos o tema lipase e biodiesel, Figura 10. A maior parte dessas pesquisas refere-se à determinação da melhor fonte de enzima e dos fatores que influenciam na reação de transesterificação, visando melhorar o rendimento do processo de produção, e assim tentando tornar o biodiesel obtido através da rota enzimática mais viável economicamente quando comparado ao biodiesel de rota química.

Figura 10 - Número de publicações entre 1996 e 2011 usando como palavras chave lipase e biodiesel.



Fonte: Web of Knowledge.

2.6 Produção de ésteres

Ésteres são importantes compostos orgânicos obtidos por síntese química (envolvendo como catalisadores da reação ácidos como ácido sulfúrico e bases como hidróxido de sódio) ou enzimática (usando lipases). Dentre suas diversas aplicações, os ésteres têm destaque como aromatizantes em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos e como agentes emulsificantes e, dependendo de sua composição, podem fazer parte de sistemas emulsificantes para uso em cremes, molhos e loções (HARWOOD, 1989; GANDHI et al., 1997). De acordo com a revista *Perfumer & Flavorist* (2010) o mercado mundial para esses compostos foi avaliado em US\$ 22 bilhões para o ano de 2009. Além disso, quando preparados por processos enzimáticos podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural, sendo, portanto, preferidos pelo mercado consumidor.

Embora a sua função natural seja a quebra das ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condição restrita de água, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos (GOMES, SILVA e CASTRO, 2004). Industrialmente, a esterificação usando lipases foi empregada comercialmente pela empresa Unichema International para a produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza e qualidade, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato, que são ingredientes empregados na formulação de cremes cosméticos e outros produtos de higiene. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subseqüentes (BOSLEY, 1997; GOMES, SILVA e CASTRO, 2004).

O uso de lipases na produção de ésteres ou de outros produtos de interesse industrial apresenta grande potencial de aplicação, entretanto, a sua utilização ainda é inviável devido ao alto custo das enzimas e a impossibilidade de reutilização. Para que a biotransformação possa competir com a rota química, faz-se necessário o desenvolvimento de um biocatalisador de baixo custo e que permita a sua reutilização ao final do processo de produção. A grande disponibilidade de matérias-primas vegetais de baixo custo (fontes potenciais de lipases), aliada a processos de extração e purificação que utilizam técnicas menos onerosas, tais como, ultrafiltração e imobilização em superfícies hidrofóbicas, possibilitando em uma só etapa a imobilização, a purificação (somente lipases são adsorvidas) e a ativação (lipase é imobilizada com a “tampa” aberta), torna-se vital o estudo sobre a possibilidade de se produzir um biocatalisador comercial a partir de lipases vegetais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Sementes, suporte e substratos

Neste trabalho, sementes de soja (*Glycine max*), girassol (*Helianthus annuus*) e mamona (*Ricinus communis* L) foram selecionadas com fontes de lipases devido a sua disponibilidade e baixo custo. Todas as sementes foram obtidas no comércio local.

Sílica macroporosa (Immobead S60S), utilizada como suporte na imobilização das lipases parcialmente purificadas, foi adquirida da Chiral Vision (Leiden, Holanda).

Azeite de oliva (Carbonell[®]) e butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB), utilizados como substratos nos ensaios de atividade hidrolítica, foram adquiridos no comércio local e da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA), respectivamente.

3.1.2 Reagentes específicos e membranas

Octiltrietoxissilano (C₈-TEOS), albumina de soro bovino (BSA), TEMED (tetrametilenodiamina), Triton[®] X-100 (polietileno glicol *tert*-octil-fenil éter), Hepdecanoato de metila, n-Butanol, Brij-35 (Brij[®] L23, polioxietileno (23) lauril éter), ácido butírico e persulfato de amônio foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Azul brilhante de Coomassie G-250 foi adquirido da Bio-Rad Laboratories (Califórnia, EUA). Acrilamida e bis-acrilamida foram adquiridas da Amersham Pharmacia Biotech Inc (EUA). Azul brilhante de bromofenol foi adquirido da Merck (Alemanha). Dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto (Tris-HCl) foram adquiridos da Hexapur (Califórnia, EUA). Goma arábica (resina natural composta de polissacarídeos e glicoproteínas) adquirido da Synth (Brasil) e fenolftaleína adquirida da Qhemis (Brasil). Membranas de polipropileno com 5 e 100 kDa de diâmetro de corte foram adquiridas da Millipore Corporation (EUA). Todos os demais reagentes foram de grau analítico PA.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação da concentração de proteína

O teor de proteína das preparações enzimática foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada na preparação da curva padrão. Após a ligação do corante azul brilhante de Coomassie G-250 com a proteína, a coloração da solução é convertida de castanho escuro a azul, e a absorvância pode ser medida em 595 nm após 5 min.

3.2.2 Determinação das atividades hidrolíticas

3.2.2.1 Hidrólise do azeite de oliva

A hidrólise do azeite de oliva foi realizada de acordo com a metodologia de Soares et al (1999), com modificações. O método consistiu na mistura de 9 mL de uma emulsão composta por 2,45 ml de azeite de oliva, 170 mg de goma arábica, 2,45 ml de água e 3,92 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0. A reação de hidrólise, conduzida a 37°C por 5 minutos, foi iniciada pela adição da solução enzimática ou do derivado (enzima imobilizada). Após esse período de tempo, adicionava-se 10 mL de etanol 95%-água 5% (1:1, base volumétrica). Os ácidos graxos liberados eram titulados com solução de KOH 0,025M, utilizando fenolftaleína como indicador. O cálculo de atividade enzimática foi realizado pela Equação (1). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por min nas condições acima descritas.

$$\text{Atividade} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min min}} \right) = \frac{(V_A - V_B) \times M \times 1000}{t \times E} \quad (1)$$

Em que: E é a quantidade de enzima utilizada no ensaio (em ml para a enzima solúvel e em mg para a enzima imobilizada), M é a molaridade da solução de KOH, t é o tempo de reação (minuto), V_A é o volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL) e V_B é o volume do KOH gasto na titulação do branco (mL).

3.2.2.2 Hidrólise do butirato de *p*-nitrofenila (PNPB)

A hidrólise de PNPB foi realizada de acordo com Palomo et al. (2002), com algumas modificações. O ensaio consistiu na medida do aumento de absorvância a 400 nm produzido pela liberação de *p*-nitrofenol (PNP) na hidrólise de PNPB 3,53 μM em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, a 25°C. A reação foi iniciada pela adição de 0,07 mL de substrato em 2,9 mL de solução enzimática (2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 e 0,4 mL de extrato enzimático). O cálculo de atividade enzimática foi realizado pela Equação (2). Uma unidade de atividade (U_{PNPB}) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de PNPB por minuto sob as condições acima descritas.

$$\text{Atividade} \left(\frac{U}{\text{g ou ml}} \right) = \frac{\frac{\Delta A}{\Delta t} \times V_R}{\left(\frac{\epsilon}{1000} \right) \times E \times l} \quad (2)$$

Onde: $\left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right)$ é o coeficiente angular obtido do gráfico “Absorvância vs. Tempo”, V_R é o volume reacional (2,97 mL), E é a quantidade de enzima utilizada no ensaio (mL para enzima solúvel e g para a enzima imobilizada), l é o comprimento do caminho óptico (1cm) e ϵ é o coeficiente de extinção molar do PNP ($4871,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a pH 7,0.

3.2.3 Eletroforese SDS - PAGE

As massas moleculares das proteínas foram estimadas por eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%) em condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970) em um sistema MiniProtean (Bio-Rad).

Poliacrilamida 12% (gel de separação) foi preparada misturando-se 3,04 mL de solução de acrilamida 30%, 1,9 mL de tampão de separação (Tris-HCl 2 M, pH 8,8), 0,076 mL de solução de SDS 10%, 2,55 mL de água milli-Q, 0,076 mL de TEMED (tetrametiletilenodiamina) e 0,076 mL de PSA (persulfato de amônia) 10%. Esta solução foi cuidadosamente transferida entre as placas de eletroforese, deixando aproximadamente 1 cm livre, onde foi adicionado isopropanol para nivelar o gel e evitar o contato do gel com o ar. Enquanto o gel de separação era polimerizado, o gel de empilhamento (poliacrilamida 4%) foi preparado com a adição de 0,364 mL de acrilamida 30%, 0,7 mL de tampão de empilhamento (Tris-HCl 2 M, pH 6,8), 0,028 mL de solução de SDS 10%, 1,71 mL de água milli-Q, 0,056 mL de TEMED e 0,028 mL de PSA a 10%. Após o término da polimerização do gel, iniciou-se a corrida, com duração de duas horas com uma voltagem de 150 V. As massas moleculares das

proteínas presentes nas amostras foram determinadas utilizando-se padrões de massa molecular, na faixa de 7 a 175 kDa. O software de digitalização de imagens Doc It LS – UVP foi utilizado para a documentação em foto.

3.2.4 Extração e purificação de lipases vegetais

Os processos de extração e purificação adotados neste trabalho são apresentados a seguir nas Figuras 11 e 12. A Figura 11 representa o procedimento adotado durante a fase inicial deste trabalho (processo I), que consistiu na escolha das sementes de oleaginosas como fontes de lipases, visando sua aplicação futura na síntese de ésteres. Enquanto a Figura 12 (processo II) representa o processo de extração de lipases após algumas modificações no processo I: alteração na temperatura e na velocidade de centrifugação, alteração na temperatura de ultrafiltração usando-se uma membrana de 100 kDa e por fim a adição de uma nova etapa de ultrafiltração, utilizando-se uma membrana de 5 kDa.

Figura 11 – Diagrama de blocos do processo (I) de extração e purificação de lipases vegetais

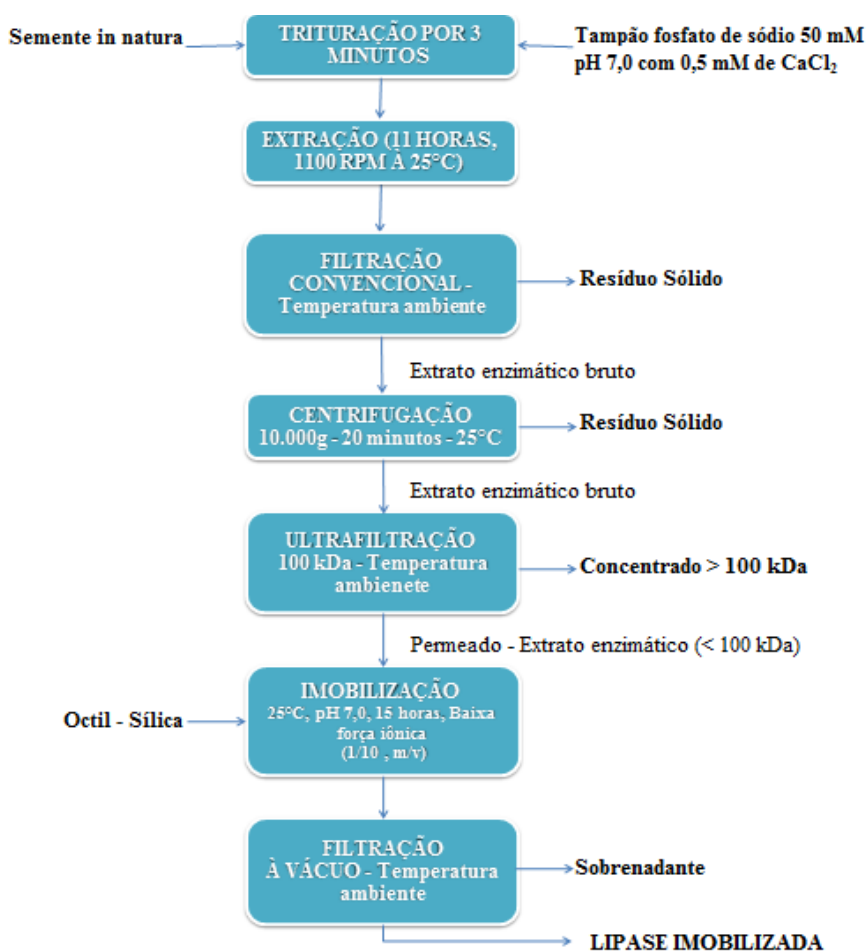
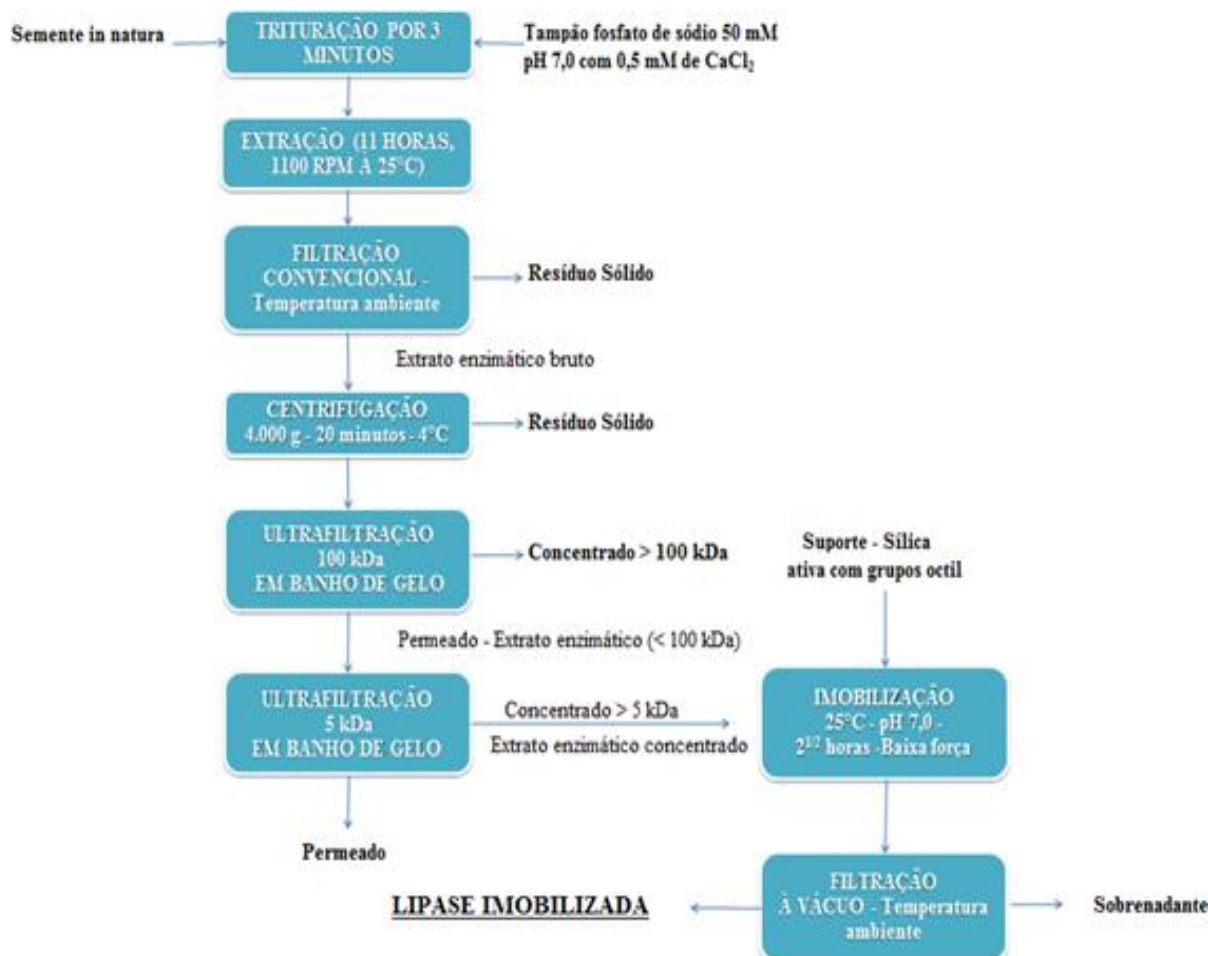


Figura 12 – Diagrama de blocos do processo (II) de extração e purificação de lipases vegetais



3.2.4.1 Extração

A extração foi iniciada com a trituração da semente em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, contendo 0,5 mM de CaCl_2 , numa razão tampão/semente igual a 4,5 (v/m), em um processador de alimentos durante 3 minutos. Após a trituração a suspensão foi mantida sob agitação constante de 1.100 rpm durante 12 horas à 25°C. Essas condições foram estabelecidas com base no trabalho de Sagiroglu e Arabaci (2005). Após o período de extração, o extrato bruto foi filtrado e submetido às etapas de purificação. Amostras do filtrado foram coletadas para medidas de atividade enzimática e concentração de proteínas, bem como para a análise de eletroforese. A torta de filtração foi também analisada quanto à umidade.

3.2.4.2 Purificação

3.2.4.2.1 Centrifugação

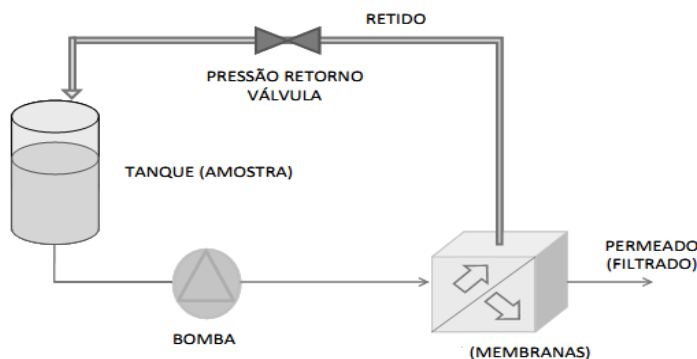
A centrifugação foi realizada com o intuito de remover partículas sólidas do extrato bruto, não removidas na etapa de filtração e que poderiam causar entupimento da membrana de ultrafiltração. Amostras dos extratos clarificados foram coletadas para medidas de atividade enzimática e proteínas, bem como para análise de eletroforese. Mediu-se também a umidade e a atividade enzimática do precipitado.

3.2.4.2.2 Ultrafiltração

O clarificado livre de partículas foi submetido a uma ultrafiltração tangencial, utilizando-se uma membrana de polipropileno com diâmetro de corte de 100 kDa. Nesse processo foram obtidas duas correntes: o concentrado, com moléculas maiores do que 100 kDa, e o permeado, com moléculas menores do que 100 kDa.

A Figura 13 mostra o esquema do sistema de ultrafiltração utilizado. O permeado de 100 kDa era coletado e o concentrado era reciclado até que seu volume final fosse 10 vezes menor que o volume inicial do extrato clarificado. Esse procedimento tinha como objetivo recuperar proteínas de interesse (lipases) ainda presentes na corrente de descarte. Para auxiliar essa recuperação e evitar problemas de entupimentos na membrana, foi adicionado ao concentrado um novo volume de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0 com 0,5 mM CaCl_2) durante a ultrafiltração. Amostras do permeado e concentrado foram coletadas para medidas de atividade enzimática e proteína, bem como análise de eletroforese.

Figura 13 - Esquema geral de funcionamento do sistema de ultrafiltração tangencial.



Fonte: Adaptado de Santos et al., 2011.

A etapa adicional de ultrafiltração em membrana de 5 kDa, introduzida no processo II, tinha por objetivo a eliminação de proteínas contaminantes de baixa massa molecular e concentração (redução de volume) do extrato enzimático. Neste processo, o permeado era descartado e o concentrado (extrato enzimático purificado) era reciclado até que o seu volume final fosse reduzido em 10 vezes. Amostras do permeado e concentrado eram coletadas para medidas de atividade enzimática e proteínas, bem como análise de eletroforese.

3.2.4.3 Produtividade

A produtividade foi o parâmetro usado para avaliar o potencial de produção de lipases das fontes vegetais selecionadas. Este parâmetro foi expresso em U/g_{seca} (Unidade lipolítica por grama de semente seca) e é calculado através da equação 3.

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Atividade} \times V}{M} \quad (3)$$

Em que: Atividade é atividade enzimática (U/ml) do extrato, V é o volume total (ml) de extrato e M_{seca} (g) é a massa de semente seca usada no processo.

3.2.4.4 Avaliação de diferentes parâmetros na extração de lipase vegetal

De modo a identificar as melhores condições de extração de lipases a partir de sementes de soja, os seguintes parâmetros foram investigados: temperatura, força iônica, tempo de germinação, tempo de extração e uso de aditivos no tampão de extração.

3.2.4.4.1 Efeito da temperatura

A extração de lipases da soja foi avaliada em duas temperaturas, 25°C e 5°C. Os demais parâmetros da extração foram mantidos constantes: tempo de extração (12 horas), agitação (1.100 rpm), razão tampão/semente (4,5 v/m) e concentração do tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0 com 0,5 mM CaCl₂). Após o término da extração, os dois extratos foram filtrados e congelados para posterior análise da atividade enzimática.

3.2.4.4.2 Efeito da força iônica

A extração de lipases da soja foi avaliada na presença de tampão fosfato de sódio com concentrações variadas (5, 10, 25 50 e 100 mM) em pH 7,0 com 0,5 mM CaCl₂. Os demais parâmetros de extração foram mantidos constantes: tempo (12 horas), agitação (900 rpm), razão tampão/semente (4,5 v/m) e temperatura (25°C). Após o término da extração, os diferentes extratos foram filtrados e congelados para posterior análise da atividade enzimática.

3.2.4.4.3 Efeito da germinação

As sementes de soja foram divididas em diferentes recipientes e submersas em água destilada até que fosse atingido o período de germinação pretendido para o ensaio. As proteínas foram extraídas das sementes germinadas com tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) à temperatura de 25°C, na razão tampão/semente de 4,5 (v/m) e agitação de 900 rpm por 12 horas. Após o término da extração, os diferentes extratos foram filtrados e congelados para posterior análise da atividade lipolítica.

3.2.4.4.4 Efeito do tempo

A atividade lipolítica durante a extração de lipases das sementes de soja foi acompanhada por um período total de 52 horas. A extração foi realizada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, com 0,5 mM CaCl₂ numa razão tampão/semente de 4,5 (v/m). A suspensão foi mantida sob agitação de 1.500 rpm à 25°C. Após o término da extração, os diferentes extratos foram filtrados e congelados para posterior análise da atividade lipolítica.

3.2.4.4.5 Efeito da presença de aditivos

Proteínas da soja foram extraídas com tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) contendo 1% (v/v) de aditivos (SDS, Triton® X-100, Tris-HCl e Brij-35). Uma extração na ausência de aditivos (controle) foi também realizada para fins de comparação. Todas as extrações foram realizadas à 25°C por 12 horas, usando uma razão tampão/semente de 4,5

(v/m) e agitação de 900 rpm. Após o término das extrações, os diferentes extratos foram filtrados e congelados para posterior análise da atividade lipolítica.

3.2.5 Imobilização de lipase em suporte hidrofóbico

3.2.5.1 Modificação química da superfície da sílica com grupos octil

Com o intuito de aumentar a hidrofobicidade da superfície, a sílica foi derivatizada com grupos octil conforme metodologia descrita por Tani e Suzuki (1996). A ativação foi realizada pela preparação de uma suspensão contendo 1 g de sílica seca e 20 mL de uma mistura de octiltrietoxissilano e tolueno na razão volumétrica 1:10. Esta suspensão foi mantida em refluxo por 3 horas a uma temperatura de aproximadamente 85°C. Após o período de ativação, filtrou-se e lavou-se o suporte com tolueno, metanol e água destilada.

3.2.5.2 Imobilização de lipase em octil-sílica

A imobilização foi realizada em sílica ativada com grupos octil (item 3.2.5), a 25°C, pH 7,0 e baixa força iônica (tampão fosfato de sódio 50 mM).

Inicialmente coletou-se uma alíquota para a dosagem de proteína e atividade inicial da solução enzimática. A seguir, o suporte ativado foi suspenso na solução enzimática (1g de suporte/ 10 ml de solução enzimática). A suspensão de imobilização foi mantida sob suave agitação durante o intervalo de 2-15 horas a temperatura de 25°C. Após esse período, a suspensão foi filtrada por sucção a vácuo. O sobrenadante foi coletado para análises de atividade enzima, proteínas e eletroforese. A enzima imobilizada foi seca à temperatura ambiente e armazenada sob refrigeração para uso posterior.

3.2.5.3 Cálculo dos parâmetros de imobilização

3.2.5.3.1 Rendimento de imobilização em termos de proteína

A porcentagem de proteína imobilizada (PI) foi calculada de acordo com a equação 4, em que P_0 é a concentração de proteína (em mg/mL) no início da imobilização, e

P_f é a concentração de proteína (em mg/mL) medida no sobrenadante ao final da imobilização.

$$PI(\%) = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100 \quad (4)$$

3.2.5.3.2 Rendimento de imobilização em termos de atividade

Rendimento de imobilização (RI) enzimática foi calculado pela equação 5, onde U_0 é a atividade inicial da solução enzimática (branco de imobilização); U_f é a atividade do sobrenadante final da imobilização. U_0 foi medida no final da imobilização, pois a enzima solúvel pode inativar-se nas condições de reação (pH, temperatura, força iônica do tampão, presença de inibidores, etc.).

$$RI(\%) = \frac{U_0 - U_f}{U_0} \times 100 \quad (5)$$

3.2.5.3.3 Atividade recuperada

A atividade recuperada (AR) foi calculada pela equação 6, em que, U_{EI} é a atividade aparente da enzima imobilizada (expressa em U/g_{suporte}); ($U_I \times RI$) é a atividade teoricamente imobilizada (expressa em U/g_{suporte}); U_I é a atividade oferecida para imobilização, expressa em U/g_{suporte}.

$$AR(\%) = \frac{U_{EI}}{(U_I \times RI)} \times 100 \quad (6)$$

A atividade oferecida para imobilização é calculada pela equação 7, onde U_{ES} é a atividade da enzima solúvel (U/mL) medida nas condições descritas em 3.2.2; V_{ES} é o volume (mL) de enzima oferecida para imobilização; M_S é a massa (em g) de suporte usado na imobilização.

$$U_I = \frac{U_{ES} \times V_{ES}}{M_S} \quad (7)$$

3.2.6 Caracterização da lipase isolada (solúvel e imobilizada)

Lipase solúvel e imobilizada foram caracterizadas quanto à sua atividade ótima em função do pH (soluções de fosfato de sódio com pH de 3 a 10) em uma temperatura fixa de 37°C. Após a determinação do pH ótimo foi realizada a caracterização da enzima solúvel e

imobilizada quanto a sua atividade ótima em função da temperatura (variando entre 27-67°C) em um pH fixo de 7,0.

A estabilidade térmica da enzima solúvel e imobilizada foi avaliada a 50°C, pH 7,0, por um período de 48 horas.

3.2.7 Aplicação de lipase de soja imobilizada na produção de ésteres

3.2.7.1 Produção de biodiesel (mistura de ésteres etílicos)

O ensaio de produção de biodiesel foi realizado em frascos fechados e mantidos sobre agitação e temperatura constantes. A reação foi conduzida a 40°C por 72 horas, utilizando uma razão óleo/etanol de 1/7 (M/M) e uma relação biocatalisador/meio reacional de 5% (m/v), sendo que o biocatalisador imobilizado apresentou uma atividade hidrolítica de 49 U/g. A concentração dos ésteres foi determinada por cromatografia gasosa, utilizando-se uma coluna carbowax (RTX® - WAX), empregando como padrão interno o heptadecanoato de metila.

3.2.7.2 Produção de butirato de butila

A atividade de esterificação da lipase imobilizada foi determinada pela formação do butirato de butila na reação de n-butanol (0,4M) com ácido butírico (0,6M) em heptano a 40°C. A reação foi realizada em reator batelada equipado com camisa de circulação de água para termostatização e condensador de refluxo para evitar perdas de reagentes ou solventes por evaporação.

A reação foi iniciada pela adição da lipase imobilizada (1,0 g, base seca) ao meio reacional (20mL), mantido sob agitação constante durante por 9 horas. Alíquotas de 1mL foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após intervalos pré-determinados. As concentrações de butanol e ácido butírico foram determinadas por cromatografia gasosa, utilizando-se uma coluna carbowax (RTX® - WAX), empregando como padrão interno heptano, butanol e ácido butírico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos neste trabalho. Na fase inicial do trabalho, foram utilizadas as sementes de girassol, mamona e soja na extração, purificação e imobilização de lipases. Com base nestes resultados, uma semente de oleaginosa (sementes de soja) foi selecionada para os ensaios posteriores.

Na segunda etapa, a partir da semente selecionada, foi realizada uma nova extração, purificação e imobilização. O derivado obtido (lipase imobilizada) foi caracterizado quanto a atividade e o pH de máxima atividade hidrolítica e quanto à estabilidade térmica. O derivado caracterizado foi utilizado na produção de biodiesel e butirato de butila.

Na extração da lipase a partir de sementes de soja (oleaginosa selecionada para este trabalho), foram avaliados os efeitos de alguns parâmetros na atividade lipolítica do extrato bruto, tais como, temperatura, tempo de extração e germinação, concentração de tampão fosfato de sódio, e presença de aditivos.

4.1 Extração de lipases a partir de sementes de oleaginosas

Inicialmente realizou-se uma triagem de atividade lipolítica em sementes de soja, girassol e mamona (processo I), a fim de se avaliar a produtividade de lipases de cada oleaginosa, expressa como unidades hidrolíticas por grama de semente seca (U/g_{seca}). As extrações foram realizadas em triplicata a fim de se avaliar a reprodutibilidade do processo. Após a filtração, analisou-se proteína e atividade nos filtrados (em triplicata). Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram uma excelente reprodutibilidade de extração para as três sementes de oleaginosas testadas (os desvios padrões não excederam a 5%). As produtividades médias foram de aproximadamente de 237, 100 e 81 U/g_{seca} , respectivamente, para as sementes de mamona, soja e girassol.

Embora as sementes de mamona tenham apresentado a melhor produção de lipases, apresentaram baixos rendimento e fator de purificação comparado às sementes de soja e girassol. O baixo rendimento de purificação deveu-se, principalmente, há grandes perdas de atividade na etapa de centrifugação, aproximadamente 74% (ver Tabela 5). Essa grande perda de atividade pode ser devido à inativação da enzima por proteases e/ou perda de massa, devido, provavelmente, a interações entre enzima e outros compostos presentes no meio,

como proteínas extremamente hidrofóbicas, que podem estar ligadas às vesículas de lipídeos das sementes.

Os resultados listados na Tabela 4 mostram que após a etapa de ultrafiltração, as atividades específicas dos extratos enzimáticos aumentaram em torno de 43, 47 e 11 vezes, respectivamente para os extratos enzimáticos obtidos a partir de sementes de soja, girassol e mamona. Esses resultados mostram a eficiência da ultrafiltração como processo de purificação, em substituição a processos cromatográficos onerosos e demorados. Mesmo para o extrato enzimático obtido a partir de sementes de mamona, cuja perda de atividade durante os processos de centrifugação e ultrafiltração foram elevadas, o fator de purificação encontrado neste trabalho (FP \approx 11) foi próximo ao valor obtido por ER-ZHENG et al., 2010 (FP \approx 16) que utilizaram métodos mais onerosos de purificação, tais como, cromatografias de troca iônica e hidrofóbica. SAGIROGLO e ARABACI (2005) isolaram e purificaram uma lipase de semente de girassol, obtendo um fator de purificação igual a 603. Entretanto, utilizaram como processo de purificação, precipitação com sulfato de amônio, seguida de diálise e permeação em gel. Além disso, os autores não reportam o rendimento global do processo (recuperação total de atividade). É importante salientar que até onde sabemos, não há resultados na literatura referentes extrações e purificações de lipases de soja.

Tabela 4 – Produtividade de lipases de sementes de oleaginosas, atividades específicas dos extratos enzimáticos (bruto e purificado) e parâmetros de purificação.

| Semente | Produtividade¹ (U/g_{seca}) | Atividade Específica do Extrato Bruto² (U/mg) | Atividade Específica do Extrato Purificado³ (U/mg) | Rendimento Global de Purificação⁴ (%) | Fator de Purificação⁵ |
|-----------------|---|---|--|---|---|
| Soja | 100,0 \pm 3,6 | 0,69 \pm 0,03 | 29,64 \pm 1,26 | 40,32 | 43,13 |
| Girassol | 81,1 \pm 2,3 | 1,08 \pm 0,03 | 47,13 \pm 1,76 | 35,46 | 46,89 |
| Mamona | 236,9 \pm 13,5 | 2,20 \pm 0,09 | 23,78 \pm 3,26 | 11,18 | 10,77 |

¹ Extrações realizadas a 25°C com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, contendo 0,5 mM de CaCl₂ (razão tampão/semente = 4,5 v/m). A produtividade foi calculada como a razão entre a atividade total no filtrado (em Unidades) e massa seca de sementes (em gramas); ² Filtrado inicial; ³ Permeado da ultrafiltração em membrana de 100 kDa; ⁴ (Unidades totais no permeado/Unidades totais no filtrado) x 100; ⁵ (Atividade específica do permeado/Atividade específica do filtrado) x 100.

Observa-se na Tabela 5 que os maiores rendimentos de purificação foram obtidos para as sementes de soja e girassol (em torno de 40% e 35%, respectivamente). A

partir de resultados da literatura, listados na Tabela 2, a maioria dos rendimentos de purificação estão na faixa de 1,7 a 31%. Alguns valores maiores são encontrados (62,14 e 80,24%), entretanto, os fatores de purificação obtidos foram muito baixos (7,6 e 2,0, respectivamente).

Tabela 5 – Atividades totais (em Unidades) e rendimentos de extração e purificação de lipases de sementes de oleaginosas (soja, girassol e mamona)

| Etapas | Atividade Total Recuperada (U) | | | Rendimento (%) | | |
|--|-----------------------------------|----------|--------|----------------|----------|--------|
| | Soja | Girassol | Mamona | Soja | Girassol | Mamona |
| Filtração | 6760 | 5373 | 11820 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| Centrifugação | 5010 | 2940 | 3026 | 74,11 | 54,72 | 25,60 |
| Ultrafiltração 100 kDa (Permeado) | 2726 | 1905 | 1322 | 40,32 | 35,46 | 11,18 |

Todas as etapas foram realizadas em triplicatas e os desvios padrões não excederam a 6%

Os extratos enzimáticos purificados por ultrafiltração foram incubados em pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM) e em pH 10,0 (tampão bicarbonato de sódio 50 mM) a 25°C. Este ensaio mostrou que as enzimas isoladas são lipases neutras, pois mantiveram integralmente suas atividades em pH 7,0 após 20 horas, ao passo que em pH 10,0 foram totalmente inativadas após uma hora.

As lipases de soja, girassol e mamona, parcialmente purificadas, foram imobilizadas por adsorção hidrofóbica em sílica-octil a 25°C, pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM), por 15 horas. O principal objetivo desse ensaio foi verificar se as lipases isoladas neste trabalho são ativadas na presença de superfícies hidrofóbicas, fenômeno conhecido como ativação interfacial (VERGER et al., 1997; BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2002; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2008, CABRERA et al., 2009).

A Tabela 6 mostra os resultados em termos de rendimento de imobilização e recuperação de atividade. Todas as lipases foram ativadas por imobilização em octil-sílica (4 a 15 vezes mais ativas que as enzimas solúveis). Essa ativação deve-se ao fato da lipase ser imobilizada com a tampa aberta, permanecendo adsorvida ao suporte na forma ativa (BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2002). Cunha et al. (2009) observaram ativação da mesma ordem de grandeza (131 a 1132%) para lipase de *Penicillium simplicissimum*.

Tabela 6 – Parâmetros da imobilização de lipases vegetais em octil-sílica (25°C, pH 7, 15 horas)

| | Soja | Girassol | Mamona |
|---|-------------|-----------------|---------------|
| Carga de Proteínas (mg/ g Suporte) | 4,92 | 3,13 | 3,87 |
| Carga Enzimática[†] (U/g Suporte) | 0,22 | 0,27 | 0,10 |
| Rendimento de Imobilização em Atividade (%) | 87,98 | 88,72 | 77,98 |
| Atividade da Enzima Imobilizada[†] (U/ g Suporte) | 1,29 | 0,99 | 1,17 |
| Atividade Recuperada (%) | 683 | 413 | 1494 |

[†]Atividades medidas com PNPB como substrato, conforme metodologia descrita em 3.2.2.2.

Com base nos resultados de produtividade de lipases (U/g_{seca}), purificação (fator de purificação e rendimento global de atividade) e ativação interfacial na presença de superfícies hidrofóbicas, selecionaram-se sementes de soja para as próximas etapas deste trabalho. Outro fator fortemente ponderado na escolha dessa oleaginosa para extração e purificação de lipases foi à ausência de trabalhos na literatura a respeito do isolamento e caracterização de lipases da soja.

4.2 Extração, purificação, imobilização e caracterização de lipase isolada de grãos de soja

Extrações de lipase de soja com diferentes lotes de sementes adquiridas no comércio local em períodos diferentes do ano mostraram que sob as mesmas condições experimentais (25°C, 900-1.100 rpm, tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, razão tampão/semente de 4,5 v/m) a produtividade média de atividade lipolítica foi de $95,95 \pm 31,61$ (média de 8 amostragens).

A Tabela 7 mostra os resultados da extração de lipase de soja utilizando-se o processo II (Figura 12 da seção 3.2.4), cujas principais alterações realizadas em relação ao processo I (Figura 11) foram redução velocidade de centrifugação (4°C e 4000 g) e redução da temperatura de ultrafiltração (etapa realizada em banho de gelo) e a adição de uma nova etapa de ultrafiltração, agora usando de uma membrana de 5 kDa . Com essas modificações no

processo de extração foi possível aumentar o rendimento global do processo (de 40,32 para 49,92%) e o fator de purificação do extrato enzimático (de 43,13 para 59,13). O aumento no rendimento de purificação pode ser explicado pela redução na velocidade de autólise (digestão de lipases por proteases presentes nos grãos de soja) devido à redução na temperatura de centrifugação e ultrafiltração (KLIBANOV, 1983).

O extrato enzimático obtido na ultrafiltração em membrana de 100 kDa foi concentrado por ultrafiltração em membrana de 5 kDa. Essa operação promoveu a concentração do extrato enzimático em aproximadamente 8 vezes, não sendo observada nenhuma perda de proteína no permeado, conforme mostra a eletroforese SDS-PAGE deste material (ver Figura 15 na seção 4.2.2). Esse extrato enzimático concentrado foi utilizado nos ensaios seguintes: imobilização de lipases em octil-sílica, eletroforese SDS-PAGE, caracterização enzimática (perfil de temperatura, pH e estabilidade térmica da enzima solúvel e imobilizada).

Tabela 7– Produtividade de lipase de grãos de soja, atividades específicas dos extratos enzimáticos (bruto e purificado) e parâmetros de purificação.

| Semente | Produtividade¹ (U/g_{seca}) | Atividade Específica do Extrato Bruto² (U/mg) | Atividade Específica do Extrato Purificado³ (U/mg) | Rendimento Global de Purificação⁴ (%) | Fator de Purificação⁵ |
|----------------|---|---|--|---|---|
| Soja | 57,9 ± 3,31 | 0,29 ± 0,03 | 17,74 ± 2,69 | 49,92 ± 11,49 | 59,13 ± 14,17 |

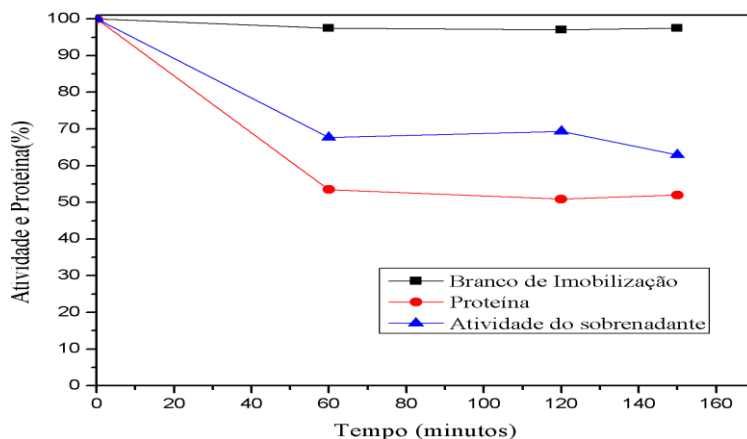
¹ Extrações realizadas a 25°C com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, contendo 0,5 mM de CaCl₂. A produtividade foi calculada como razão entre a atividade total no filtrado (54.810 U) e massa seca de grãos de soja (947,8 g); ² Filtrado inicial (54.810 U e 182,2 g de proteínas); ³ Permeado da ultrafiltração em membrana de 100 kDa (27.360 U e 1,542 g de proteínas); ⁴ (Unidades totais no permeado/Unidades totais no filtrado) x 100; ⁵ (Atividade específica do permeado/Atividade específica do filtrado) x 100.

4.2.1 Imobilização em sílica-octil de lipase de soja purificada pelo processo II

Lipase de soja foi imobilizada por adsorção hidrofóbica em octil-sílica a 25°C, pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM) e 2,5 horas de reação. Na Figura 14 são apresentados os perfis de proteína e atividade hidrolítica no sobrenadante de imobilização. O perfil de atividade do branco (atividade do extrato enzimático) é praticamente constante, mostrando que não houve perda de atividade da enzima solúvel nas condições de

imobilização. Os perfis de proteína e atividade mostram que foram imobilizadas aproximadamente 50% e 32% da proteína e da atividade inicial, respectivamente.

Figura 14 – Perfis de proteínas e atividade hidrofóbica no sobrenadante de imobilização de lipase de soja em octil-sílica (25°C, pH 7,0)



A Tabela 8 mostra que a imobilização de lipase de soja em octil-sílica rendeu um derivado com 99,5 U/g_{suporte}. A lipase imobilizada foi aproximadamente 3 vezes mais ativa que a enzima solúvel (recuperação de atividade de 331%). A diferença no valor de ativação da enzima imobilizada com relação ao obtido anteriormente (recuperação de atividade de 683%, Tabela 6) pode ser devido à utilização de substratos diferentes na medida de atividade. Azeite de oliva é um triglicerídeo com ácidos graxos de cadeias carbônicas longas ligadas ao esqueleto de glicerol, enquanto PNPB é um éster de cadeia carbônica curta (apenas quatro carbonos). Portanto, a velocidade de hidrólise desses substratos é diferente, devido à especificidade das enzimas por seus substratos. Em se tratando de lipases, a especificidade é uma propriedade que varia de acordo com a espécie produtora.

Suzuki et al (2004) estudaram a especificidade de lipases extraídas de sementes de trigo utilizando substratos com cadeias carbônicas de diferentes tamanhos, p-nitrofenil acetato (dois carbonos), p-nitrofenil butirato (quatro carbonos), p-nitrofenil caproato (seis carbonos) e p-nitrofenil laurato (doze carbonos). Os autores verificaram que a atividade enzimática era fortemente dependente do comprimento da cadeia carbônica. A maior atividade foi exibida com p-nitrofenil laurato como substrato e a menor foi exibida com p-nitrofenil butirato.

Prabhu et al (1999) verificaram que lipase extraída de farelo de arroz exibiu atividade hidrolítica 4,5 vezes maior com tributirina (triglicerídeo com ácidos butíricos ligados ao esqueleto de glicerol) como substrato, ao invés de azeite de oliva. Sagiroglu e

Arabaci (2005) verificaram que lipase extraída de semente de girassol apresentava duas vezes mais atividade hidrolítica frente a óleo de oliva, ao invés de tributirina como substrato. A utilização de diferentes tipos de óleos como substrato também foi motivo de estudo em alguns trabalhos envolvendo o uso de lipases vegetais na hidrólise desses óleos, sendo o azeite de oliva o óleo que apresentou uma alta atividade independente da origem da lipase (SANA et al., 2004; YEŞİLOĞLU, Y.; DEMIRKAN, B., 2010; ER-ZHENG et al., 2010).

Embora valores diferentes de ativação interfacial tenham sido obtidos neste trabalho, é evidente que lipases de soja possuem uma “tampa” moduladora de atividade. Na presença de interfaces hidrofóbicas (neste caso, octil-sílica) a lipase de soja foi imobilizada com a tampa aberta, permanecendo adsorvida ao suporte na forma ativa.

Tabela 8 – Parâmetros da imobilização de lipase de soja em octil-sílica (25°C, pH 7, 2,5 horas)

| Parâmetros de Imobilização | |
|--|-------|
| Carga de Proteínas (mg/ g_{suporte}) | 11,88 |
| Carga Enzimática[†] (U/g_{suporte}) | 92,25 |
| Rendimento de Imobilização (% de atividade) | 32,54 |
| Atividade da Enzima Imobilizada[†] (U/g_{suporte}) | 99,5 |
| Atividade Recuperada (%) | 331 |

[†]Atividades medidas com azeite de oliva como substrato, conforme metodologia descrita em 3.2.2.1.

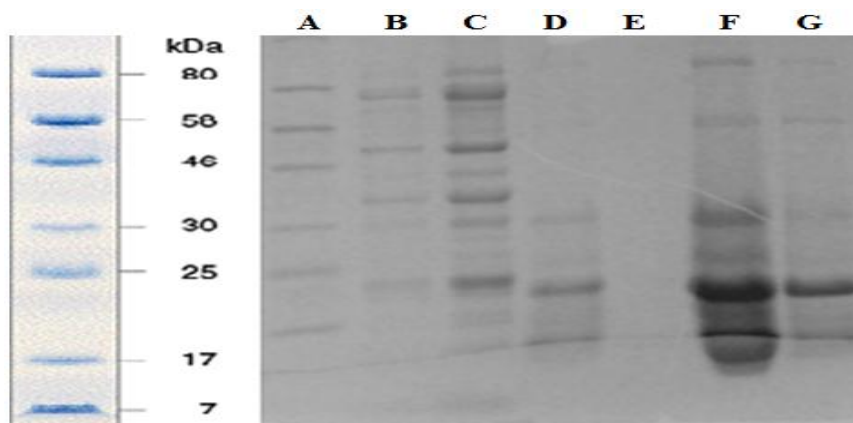
4.2.2 Eletroforese

Eletroforese SDS-PAGE foi utilizada para acompanhar qualitativamente o processo de extração e purificação da lipase de soja, além de ser utilizada para uma estimativa da massa molecular das lipases extraídas.

A Figura 15 mostra inicialmente no filtrado (B) a presença de bandas fracas de diferentes massas moleculares, que se mostram com maior intensidade após a realização da centrifugação (C). Após a etapa de ultrafiltração em membrana de 100 kDa (D), foi possível

observar que as proteínas grandes presentes no centrifugado foram reduzidas significativamente, sendo apenas preservadas as proteínas de baixa massa molecular. No permeado da ultrafiltração em membrana de 5 kDa (E) não foi detectada a presença de proteínas, mostrando que essa etapa serviu unicamente para a concentração do extrato enzimático (F). Nessa fração, observa-se a presença de duas bandas de maior intensidade, com massas moleculares de aproximadamente 20 e 30 kDa. Após a imobilização em octil-sílica, o sobrenadante final da imobilização (G) mostra que a banda de 30 kDa praticamente desapareceu, permanecendo com menor intensidade a banda de 20 kDa. Bandas de massas moleculares maiores são observadas tanto no sobrenadante final da imobilização como no extrato enzimático purificado (F). Esses resultados mostram que a imobilização em octil-sílica foi seletiva para lipase. Além disso, como apenas 32,54% da atividade lipolítica oferecida foi imobilizada (Tabela 8), pode-se suspeitar da existência de duas lipases no extrato enzimático das sementes de soja, uma de massa molecular de 30 kDa que imobilizada rapidamente em octil-sílica e outra de 20 kDa, presente em maior quantidade no extrato enzimático (em torno de 68%) e que imobiliza mais lentamente em octil-sílica. Essas duas frações devem ser futuramente melhor estudadas a fim de se caracterizar completamente as duas possíveis lipases no extrato proteico das sementes de soja. A presença de duas lipases distintas em extratos proteicos vegetais também foi observada por Suzuki, Honda e Mukasa (2004), extraíndo lipases das sementes de trigo. As lipases isoladas exibiram propriedades muito distintas, uma com massa molecular de 150 kDa, pH ótimo de 3,0 e temperatura ótima de 30°C. A outra, com massa molecular de 28,4 kDa, pH ótimo de 6,0 e temperatura ótima de 40°C.

Figura 15 – Eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%) dos extratos enzimáticos de sementes de soja



(A) padrão da massa molecular, (B) filtrado da extração de proteínas da soja, (C) clarificado da centrifugação, (D) permeado da ultrafiltração em membrana de 100 kDa, (E) permeado da ultrafiltração em membrana de 5 kDa, (F) concentrado da ultrafiltração em membrana de 5 kDa (antes da imobilização), (G) sobrenadante final da imobilização em octil-sílica.

4.2.3 Propriedades catalíticas do extrato enzimático e da lipase imobilizada

A atividade catalítica de uma enzima imobilizada, por mais suave que seja o método de imobilização, pode ser alterada devido a uma série de efeitos (BLANCH; CLARK, 1997; VITTOLO, 2001), dentre eles:

- (i) Efeitos conformacionais e estéricos: a conformação da molécula de enzima pode ser alterada pela imobilização, influenciando sua eficiência catalítica. Além disso, a molécula de enzima pode ser imobilizada com o sítio ativo voltado para o suporte, tornando o acesso do substrato mais difícil, acarretando redução na atividade;
- (ii) Efeitos eletrostáticos ou de partição: a concentração de espécies químicas importantes (íons H^+ , moléculas de substrato ou produto) no microambiente próximo a enzima imobilizada pode ser diferente daquela do resto da solução, devido às propriedades físico-químicas do suporte, como por exemplo, suportes carregados (positivamente ou negativamente), inertes ou hidrofóbicos;
- (iii) Efeitos difusionais: a velocidade da reação enzimática pode ser limitada pela taxa de difusão do substrato na superfície externa do suporte e pela taxa de difusão do substrato no interior dos poros do suporte;

(iv) Mudança na estabilidade da enzima (térmica ou ao pH).

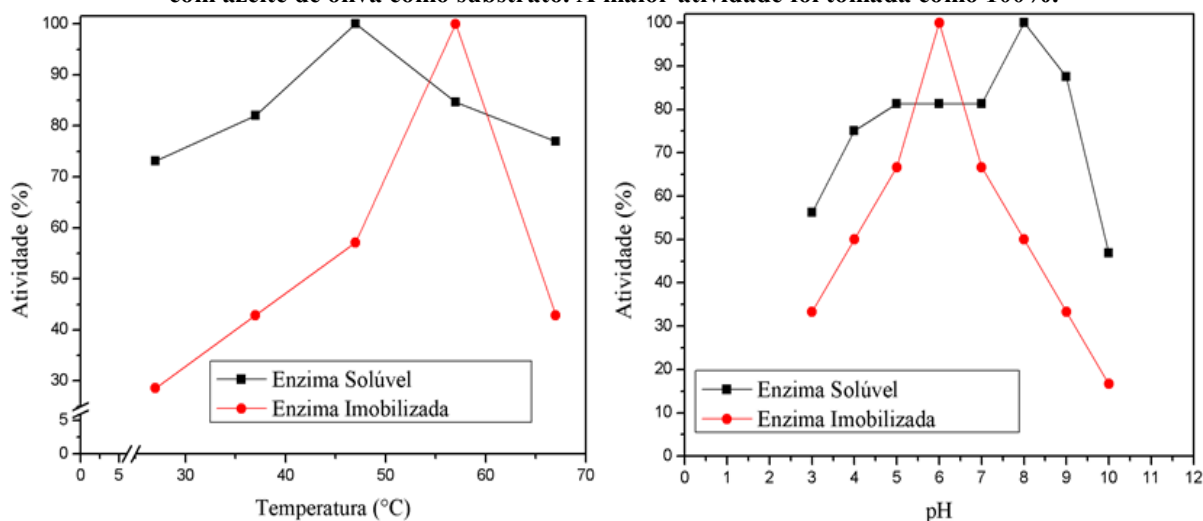
Portanto, para cada caso sistema enzima-substrato há de se determinar as condições ótimas de operação, particularmente a temperatura e o pH.

Neste trabalho avaliou-se a temperatura e o pH ótimo para a atividade hidrolítica, bem como a estabilidade térmica da lipase solúvel (extrato enzimático parcialmente purificado) e imobilizada em octil-sílica (sílica hidrofobizada com grupos octil).

4.2.3.1 Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase livre e imobilizada

A Figura 16 mostra os perfis de atividade em função da temperatura e do pH para a lipase de soja na forma solúvel e imobilizada.

Figura 16 – Perfis de atividade em função da temperatura (pH 7,0) e do pH (37° C). Atividades medidas com azeite de oliva como substrato. A maior atividade foi tomada como 100%.



A atividade de máxima atividade catalítica da enzima imobilizada ficou em torno de 57°C, enquanto a da enzima solúvel ficou em torno de 47°C. A enzima solúvel manteve mais de 70% da atividade máxima em toda a faixa de temperatura estudada, enquanto a enzima imobilizada tem sua atividade bruscamente reduzida fora da temperatura ótima.

O deslocamento da temperatura ótima de 47°C para 57°C com a imobilização pode ser explicado por uma maior estabilidade térmica da lipase imobilizada, já que o ótimo aparente de temperatura observado nos perfis *atividade-temperatura* é o resultado de dois processos: aumento da velocidade de reação com a temperatura (Lei de Arrhenius) e crescente

desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica (WHITAKER, 1994; LENINGHER et al., 1995).

O pH de máxima atividade hidrolítica para a lipase solúvel foi de 8,0, enquanto para a enzima imobilizada foi de 6,0. Novamente, a atividade máxima da enzima imobilizada situa-se numa faixa estreita de pH, sendo bruscamente reduzida fora desta faixa. Por exemplo, nos extremos da faixa de pH estudada, a enzima imobilizada apresenta aproximadamente 32% (pH 3,0) e 15% (pH 10,0) da atividade máxima, enquanto a enzima solúvel mantém em torno de 55% (pH 3,0) e 45% (pH 10,0) da atividade máxima.

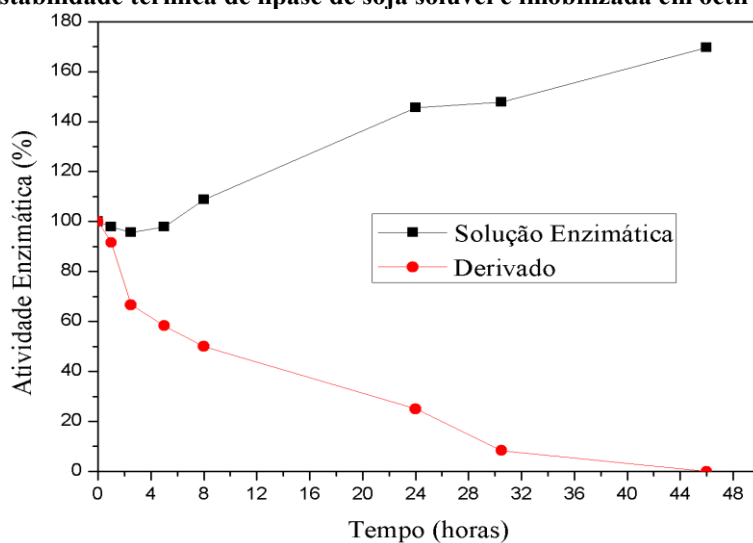
O deslocamento do pH ótimo de 8,0 (enzima solúvel) para 6,0 (enzima imobilizada) pode estar associado ao efeito de partição dos íons hidroxônio devido ao caráter ácido da sílica. Além disso, merece destacar que o extrato enzimático pode apresentar duas isoformas de lipases, das quais uma é preferencialmente imobilizada em octil-sílica. Essas prováveis isoformas podem apresentar propriedades catalíticas distintas, como observado por Suzuki, Honda e Mukasa (2004) para isoformas de lipases isoladas a partir de sementes de trigo: lipase I com pH e temperatura ótima de 3,0 e 30°C, respectivamente; lipase II com pH e temperatura ótima de 6,0 e 40°C, respectivamente.

4.2.3.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das lipases solúvel e imobilizada em octil-sílica foi realizada a 50°C, pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM). As atividades residuais foram acompanhadas em intervalos regulares de tempo usando azeite de oliva como substrato.

A Figura 17 mostra que a enzima imobilizada inativou-se com o tempo, apresentando uma meia-vida de aproximadamente 7 horas. No entanto, a enzima solúvel mostrou um comportamento atípico, com a atividade aumentando com tempo de incubação. Ensaio de inativação foram realizados em triplicata e confirmaram tal comportamento. Esse de aumento de atividade pode ser devido, provavelmente, à presença de açúcares e outras proteínas contaminantes no extrato enzimático que atuaram como preservantes da atividade catalítica da lipase. A presença de açúcares ou outros polióis em soluções aquosas de enzimas fortalece as interações hidrofóbicas entre resíduos de aminoácidos apolares, rigidificando a macromolécula de proteína e, por conseguinte, tornando-as mais resistentes à inativação por preda da conformação tridimensional da estrutura proteica (KLIBANOV, 1983).

Figura 17 – Estabilidade térmica de lipase de soja solúvel e imobilizada em octil-sílica, a 50°C, pH 7,0.



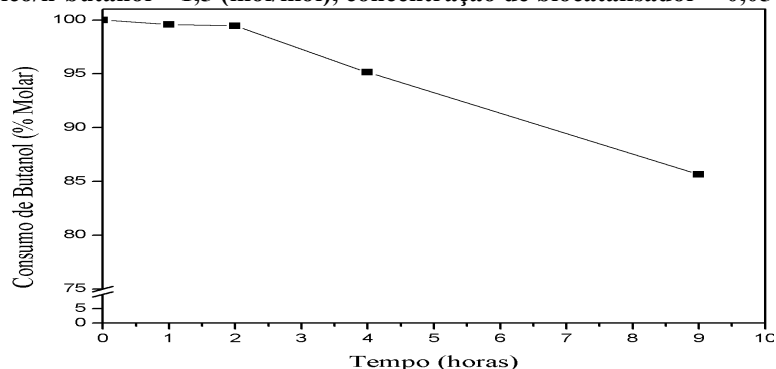
4.2.4 Síntese do butirato de butila

Lipase de soja imobilizada em octil-sílica foi utilizada na síntese de butirato de butila em heptano a 40°C, conforme metodologia descrita na seção 3.2.7.2. A reação foi monitorada através do consumo de n-butanol por cromatografia gasosa.

A Figura 18 ilustra o perfil de consumo de n-butanol com o tempo, mostrando uma conversão de 15% em 9 horas de reação. Baixa conversão desta reação também foi obtida por Oliveira et al., 2000 (25% de conversão em 10 h de reação a 45°C) utilizando como biocatalisador lipase de *Candida rugosa*.

Os resultados obtidos neste trabalho motivam a exploração do potencial de aplicação deste biocatalisador (lipase de soja imobilizada em octil-sílica) em reações de interesse industrial, tais como, síntese de aromas de frutas e biosurfactantes (ésteres de açúcares de ácidos graxos) e hidrólise de óleos vegetais.

Figura 18 – Consumo de butanol na síntese de butirato de butila a 40°C em heptano. Relação ácido butírico/n-butanol = 1,5 (mol/mol), concentração de biocatalisador = 0,05 g/ml.



4.2.5 Produção de biodiesel

Verificou-se neste trabalho que lipase extraída do grão germinado de soja e imobilizada por adsorção hidrofóbica em sílica-octil não apresentou atividade de transesterificação, pelo menos nas condições ensaiadas (40°C, 72 horas de reação, relação molar óleo refinado de soja:etanol de 1:7). Uma possível alternativa para contornar essa deficiência seria a produção de biodiesel por hidroesterificação (TING *et al.*, 2008), ou seja, hidrólise enzimática do óleo de soja catalisada pela lipase de soja, seguida por esterificação dos ácidos graxos liberados via catálise enzimática (usando outra lipase, por exemplo, lipase de *Candida antarctica*) ou catálise ácida.

4.3 Extração de lipases a partir de sementes de soja

Esta etapa do trabalho objetivou selecionar as melhores condições para a extração de lipases de grãos de soja. Foram investigadas as influências da temperatura e do tempo de extração, força iônica e presença de aditivos no tampão de extração e germinação das sementes.

4.3.1 Efeito da temperatura

A Tabela 9 apresenta as atividades volumétricas e específicas dos extratos enzimáticos brutos obtidos por extração de lipases a partir de sementes de soja à 25°C e 5°C. Os resultados mostram que a temperatura não influenciou significativamente na atividade volumétrica do extrato bruto, portanto, o pequeno ganho de atividade na extração a 5°C não justifica o custo extra de refrigeração. Durante a extração das proteínas da soja, outras enzimas são solubilizadas, como as proteases. Essas enzimas podem inativar lipases por hidrólise de ligações peptídicas e essa inativação poderia ser maior à temperatura ambiente. Entretanto, durante a extração de proteínas da soja com soluções salinas, inibidores de proteases (inibidor de tripsina de soja Kunitz, KSTI, e inibidor de tripsina Bowman Birk, BBI) também são solubilizados (CATSIMPOOLAS e EKENSTAM, 1969; WOLF, 1970), os quais, provavelmente, auxiliaram na preservação da atividade lipolítica do extrato enzimático.

Tabela 9 Comparativo do efeito da temperatura na extração de lipase a partir de sementes de soja

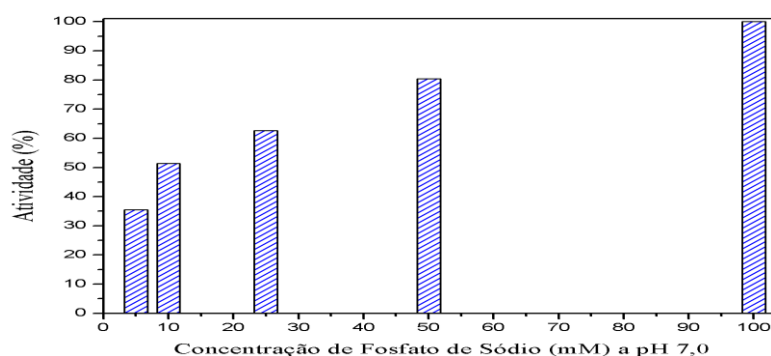
| Etapas | Atividade (U/ml) | | Proteína (mg/ml) | | Atividade Específica (U/mg) | |
|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------------------|------------------|
| | T _{25°C} | T _{5°C} | T _{25°C} | T _{5°C} | T _{25°C} | T _{5°C} |
| Filtração | 14,53 | 16,51 | 14,23 | 18,63 | 1,02 | 0,89 |

Condições de extração: Tampão fosfato de sódio 50 mM (0,5 mM CaCl₂ pH 7,0), 12 h a 1.100 rpm, razão tampão/semente (4,5 v/m).

4.3.2 Efeito da força iônica

A Figura 19 mostra o efeito da concentração de fosfato de sódio na extração de lipases a partir de grãos de soja. Observa-se que a atividade lipolítica do extrato enzimático bruto aumenta com o aumento da concentração do tampão de extração, atingindo seu maior valor a uma concentração de 100 mM, pelo menos para a faixa de concentrações avaliada. De acordo com o processo de "salting-in" o aumento da força iônica favorece o aumento da carga iônica ao redor da enzima que, conseqüentemente, favorece sua solubilização (LEHNINGER, 1976) Por isso, para a faixa de concentrações avaliadas, o aumento da concentração de sal aumentou a extração de lipases de grãos de soja.

Figura 19 – Efeito da força iônica na extração de lipases de grãos de soja

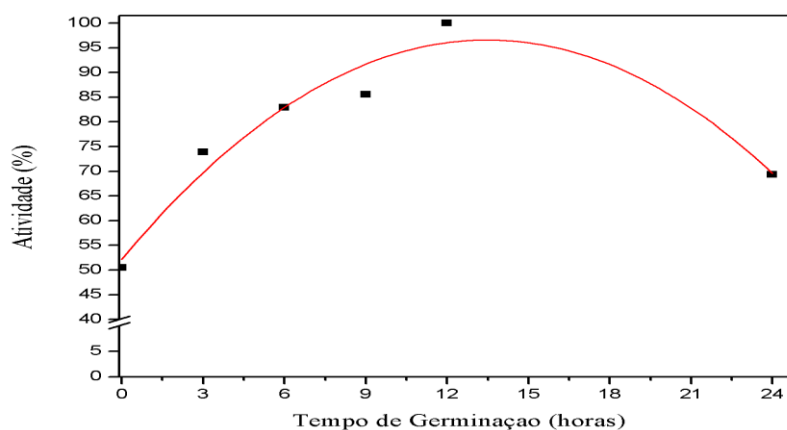


4.3.3 Efeito da germinação

Observa-se na Figura 20 que a atividade lipolítica das sementes de soja aumentou com o tempo de germinação, apresentando um pico de máxima atividade após 12 horas de germinação. Urquhart et al. (1984) observaram comportamento semelhante na

germinação de grãos de aveia. Após 12 horas, observa-se um decréscimo da atividade catalítica da enzima, devido, provavelmente, ao aumento da concentração de acil-CoA (produto da reação de β -oxidação de lipídeos), que podem inibir a enzima durante o período de germinação (HILLS; MURPHY; BEEVERS, 1989). Há também a influência do ácido giberélico sobre a ação da lipase, regulando a distribuição da enzima associada a proteínas de membrana (forma de armazenamento) para corpos de lipídeos (forma ativa) via difusão lateral, expondo os sítios ativos das lipases aos seus substratos (triacilglicerídeos estocados dentro dos corpos de lipídeos) (FERNANDEZ; STAEHELIN, 1987).

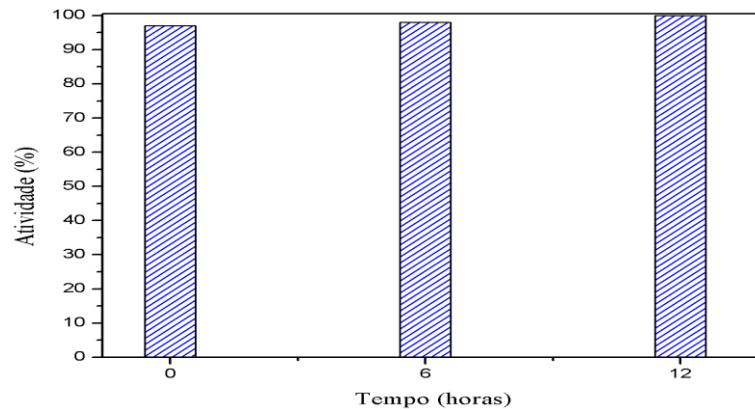
Figura 20 – Efeito da germinação na extração da lipase a partir da semente de soja (% em relação a maior atividade).



4.3.4 Efeito do tempo

A Figura 21 apresenta a atividade no extrato enzimático bruto em função do tempo de extração de lipases a partir de sementes de soja. Observa-se que o tempo não influenciou significativamente a atividade enzimática, permanecendo constante durante 12 horas de extração. Uma explicação para esse comportamento deve-se ao fato que uma fração de proteínas da soja é rapidamente solubilizada em solução aquosa salina, incluindo nesta fração algumas enzimas (proteases, lipases, etc.). Tempo maior de extração é requerido para a solubilização de proteínas de alta massa molecular (glicinina e β -conglucina, por exemplo, GARCIA *et al.*, 1998; RIBLETT *et al.*, 2001), as quais contaminariam o extrato enzimático bruto, reduzindo sua atividade específica.

Figura 21 – Efeito do tempo na extração da lipase a partir da semente de soja.



4.3.4 Efeito da presença de aditivos

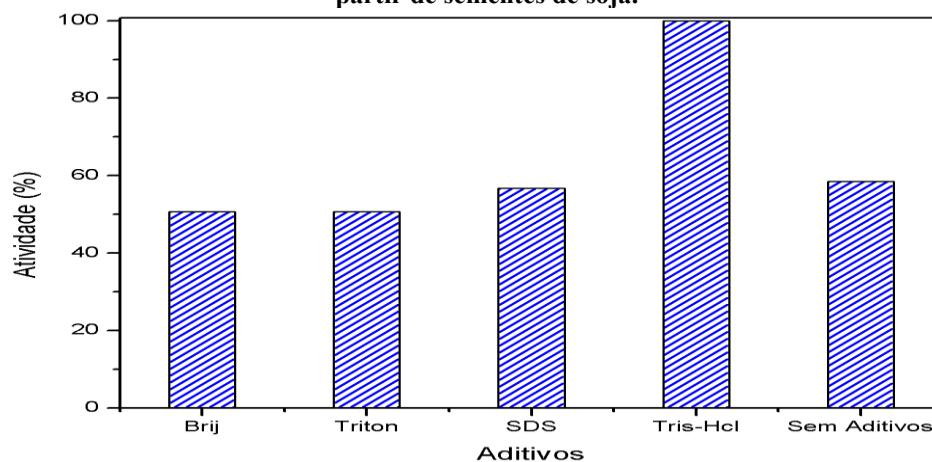
Neste ensaio verificou-se a influência dos surfactantes Triton® X-100, Brij-35 e SDS na extração/solubilização de lipases de sementes de soja. Triton® X-100 e Brij-35 (Brij® L23) são surfactantes não iônicos (detergentes) que reduzem a tensão superficial da água, e são usados na solubilização de proteínas de membrana em condições suaves não desnaturantes (SIGMA-ALDRICH). SDS (dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio) é um surfactante aniônico, com propriedades detergentes e desnaturante forte de proteínas. O SDS se liga à maioria das proteínas na relação “uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos”. Esta ligação confere à molécula de proteína grande carga negativa, proporcionando inclusive a desdobra parcial da molécula, podendo leva-la à inativação (NELSON; COX, 2011).

A presença de surfactantes em solução (abaixo da concentração micelar crítica) pode favorecer a solubilização de lipases, dada a afinidade destas enzimas por estes compostos. Na ausência de surfactantes a lipase existe na forma fechada, enquanto na sua presença, a tampa se abre, atingindo atividade máxima. Entretanto, acima da concentração micelar crítica o tensoativo pode inibir a ação da enzima decorrente da interação do tensoativo com o seu sítio ativo, podendo inclusive provocar distorções destrutivas neste (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2007).

Verificou-se neste trabalho (Figura 22) que todos os surfactantes testados não promoveram aumento na atividade enzimática do extrato bruto, seja por solubilização extra de

lipase, seja por ativação da enzima. A atividade específica de todos os extratos enzimáticos ficou em torno de $1,1 \pm 0,1$ U/mg. Surpreendentemente, o uso de Tris-HCl (1%, m/v) no tampão de extração praticamente triplicou a atividade enzimática específica do extrato bruto (aproximadamente 2,6 U/mg). Esse comportamento requer um estudo mais detalhado, uma vez que é relatado que Tris inibe a ação de certas enzimas e, portanto, deve ser usado com cautela no estudo de proteínas (GHALANBOR et al., 2008).

Figura 22 – Efeito da adição de aditivos no tampão de extração (fosfato de sódio 50 mM) de lipases a partir de sementes de soja.



5 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram as seguintes:

- As sementes de oleaginosas investigadas neste trabalho mostraram grande potencial de produção de lipases. Extrações com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, contendo 0,5 mM de CaCl_2 , a 25°C, razão tampão/semente de 4,5 (v/m), renderam produtividades médias de $(236,9 \pm 13,5)$, $(100,0 \pm 3,6)$ e $(81,1 \pm 2,3)$ U/g_{seca}, respectivamente para sementes de mamona, soja e girassol. Particularmente, as sementes de soja despertaram interesse de investigação neste trabalho pela ausência de estudos na literatura a respeito de extração, isolamento e caracterização de lipases desta oleaginosa.
- As condições experimentais que maximizaram a produção e extração de lipases de soja foram germinação das sementes por 12 horas, extração a 25°C por 12 horas, solução salina (fosfato de sódio, pH 7,0) de 100 mM e adição de Tris-HCl (1%, m/v) no tampão de extração.
- A clarificação do extrato bruto por centrifugação e a purificação por ultrafiltração tangencial em membrana de 100 kDa, permitiram a obtenção de fatores de purificação de aproximadamente 47, 43 e 11, respectivamente para as sementes de girassol, soja e mamona. As recuperações de atividade nos extratos enzimáticos purificados ficaram em torno de 40, 35 e 11%, respectivamente para soja, girassol e mamona.
- A imobilização das lipases de sementes de mamona, soja e girassol em suporte hidrofóbico (octil-sílica) sugeriu que todas apresentam “tampa” moduladora de atividade, exibindo ativação interfacial na presença de superfícies hidrofóbicas.
- A imobilização de lipase de soja em octil-sílica mostrou que possivelmente há duas isoformas de lipases no extrato enzimático, com massas moleculares de aproximadamente 20 e 30 kDa.
- Lipase de soja solúvel apresentou atividade catalítica máxima em 47°C e pH 8,0. A imobilização em octil-sílica deslocou a atividade máxima para 57°C e pH 6,0. A enzima imobilizada apresentou meia-vida a 50°C pH 7 de aproximadamente 8 horas. Não foi possível estimar a meia-vida da enzima solúvel, pois nas condições ensaiadas sua estabilidade térmica aumentou com o tempo de incubação, devido provavelmente à presença de açúcares no extrato enzimático.

- Na síntese de butirato de butila, catalisada por lipase de soja imobilizada em octil-sílica, obteve-se uma conversão em torno de 15% em 9 horas de reação a 40°C, na presença de heptano.
- A lipase extraída e imobilizada a partir da semente de soja germinada não apresentou atividade de transesterificação.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTURO

- Separar as duas possíveis isoformas de lipases da soja a fim de caracterizá-las quanto ao ponto isoelétrico, pH e temperatura de máxima atividade catalítica e estabilidade térmica e ao pH;
- Avaliar a eficiência de outras técnicas de purificação (precipitação com sulfato de amônio, adsorção em resinas hidrofóbicas, etc.) na recuperação da atividade catalítica no extrato enzimático das sementes de soja.
- Estudar a especificidade da lipase da soja quanto ao comprimento da cadeia carbônica do substrato;
- Avaliar a atividade enzimática da lipase de soja na hidrólise de diferentes óleos vegetais, síntese de aromas de frutas, ésteres de açúcares de ácidos graxos, etc.
- Avaliar possíveis aplicações para os resíduos da extração de lipases a partir das sementes de soja, tais como, farelo e fração proteica obtida no concentrado da ultrafiltração em membrana de 100 kDa.

7 REFERÊNCIAS

ABIGOR, R. D. et al. Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal of the American oil Chemists' Society**. v. 79, n. 11, p.1123-1126, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO – ANP. **Produção de Biodiesel - Metros Cúbicos**. 2011b. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=58033&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1318183312237>>. Acessado em: 09/02/2012.

ARRESE, E. L.; WELLS, M. A. Purification and properties of a phosphorylatable triacylglycerol lipase from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. **Journal of Lipid Research**, v.35, 1994.

BARON, A, M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. 2008. p.138. Tese – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BASTIDA, A. et al. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, n.5, p.486-493, 1998.

BCC RESEARCH. Global markets for enzymes in industrial applications. Disponível em <http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>. Acesso em 24/06/2011.

BHARDWAJ, K.; RAJU, A.; RAJASEKHARAN, R. Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A New Member of the (Phospho) Lipase Family. **Plant physiology**. v.127, p. 1728-1738, 2001.

BLANCH, H. W.; CLARCK, D. S. Biochemical engineering. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.

BOSLEY, J. Turning lipases into industrial biocatalysts. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 25, p.174-178, 1997.

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

BRADY, L.; BRZOZOWSKY, A. M.; DEREWENDA, Z. S., et al., “A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase”, *Nature*, v. 343, pp. 767-770, 1990.

BRANCO, R. V. **Imobilização e caracterização de uma esterase termoestável recombinante de *Pyrococcus furiosus***. 2008. 76 f. Dissertação – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

CABRERA, Z. et al. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p.171-176, 2009.

CARO, Y. et al. Lipase activity and fatty acid typoselectivity of plants extracts in hydrolysis and interesterification. **Journal of the American Oil Chemist’s Society**, v.77, n.4, p.349-354, 2000.

CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80, 2003.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

COPABIANGO, M. et al. Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. n.26, v.4, p.884-890, 2006.

COSTA NETO, P. R. et al. Produção de bicompostíveis alternativos ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usando frituras, **Química Nova**, v.23, n.4, p.531-537, 2000.

CUNHA, A. G. et al. Separation and immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.156, p.563-575, 2009.

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

DEREWENDA, U. et al. Catalysis at the interface: The anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**. v.31, p.1532-1541, 1992.

D'SOUZA, T. M.; ORIEL, P. Purification and characterization of amb pregastric lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.36, p.183-198, 1992.

EGELRUD, T.; OLIVECRONA, T. The purification of a lipoprotein lipase from bovine skim milk. **The Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.19, p.6212-6217, 1972.

EJEDEGBA, B. O.; ONYENEKE, E. C.; OVIASOGIE, P. O. Characteristics of lipase isolated from coconut (*Cocos nucifera linn*) seed under different nutrient treatments. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.6, p.723-727, 2007.

ENUJIUGHA, V. N. et al. Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla Benth*). **Food Chemistry**, v.88, p. 405-410, 2004.

ER-ZHENG, S. et al. Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization. **Journal of Shanghai University**, v.14, p.137-144, 2010.

FABER, K.; In: Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook , 3rd Edition, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, 1997.

FERNÁNDES-LORENTE, G. et al. 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.

FERNÁNDES-LORENTE, G. et al. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated Glyoxyl-Agarose. **Biomacromolecules**, v.6, p.2553-2561, 2008.

FERNANDEZ, D. E.; STAEHELIN, L. A. Does gibberellic acid induce the transfer of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells?, **Plant Physiology**, n.85, p.487-496, 1987.

FORJAN, P. et al. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. **Biochemie**, v.82, n.11, p.1033-1041, 2000.

GANDHI, N. N., Applications of lipase. **Journal of the American oil Chemists' Society**, vol. 74, n. 6, p.621-634, 1997.

GARCIA, M.C. et al. Chemical Characterization of Commercial Soybean Products. **Food Chemistry**, v.62, n.3, p.325-331, 1998.

GERIS, R. et al. Biodiesel de soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**. vol.30, N. 5, p.1369-1373, 2007.

GHALANBOR et al. Binding of Tris to *Bacillus licheniformis* α -amilase can affect its starch hydrolysis activity. **Protein and Peptide Letters**, v. 15, n. 2, p. 212-214, 2008.

GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**. v.59, p.115-142, 2008.

GOMES, F. M.; SILVA, M. B.; CASTRO, H. F. Avaliação das condições reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila empregando lipase de *Candida rugosa*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.2, p.189-195, 2004.

HARWOOD, J. The versatility of lipases for industrial uses. **Trends in Biochemical Sciences**, Oxford, v. 14, p.125-126, 1989.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HELLYER, S. A.; CHANDLER, I. C.; BOSLEY, J. A. Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride?. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1440, p.215-224, 1999.

HILLS, M. J.; MURPHY, D. J.; BEEVERS, H. Inhibition of neutral lipase from castor bean lipid bodies by coenzyme A (CoA) and Oleoyl-CoA. **Plant Physiology**, n.89, p1006-1010, 1989.

ISBILIR, S. S.; OZCAN, H. M.; YAGAR, H. Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis L.*) Seeds. **Journal of the American oil Chemists' Society**, v.85, p.227-233, 2008.

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

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

JOÃO, J. J.; ZANELLA, C. R. Utilização de enzimas em meio orgânico. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, n° 16, p.32-36, 2000.

KAPRANCHIKOV, V. S.; ZHEREBTSOV, N. A.; POPOVA, T. N. Purification and characterization of lipase from wheat (*Triticum aestivum L.*) germ. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, n.1, p.84-88, 2004.

CATSIMPOOLAS, N.; EKENSTAM, C. Isolation of alpha, beta, and gamma conglycinins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 129, n. 2, p. 490-497, 1969.

KIM, Y. H. Purification and biochemical analysis of rice bran lipase enzyme. **Journal of Plant Biotechnology**, v.6, n.1, p.63-67, 2004.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência Tecnológica Alimentícia**, Campinas, v.24, p. 287-292, 2004.

JAEGER, K., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., et al., "Bacterial lipases", **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.

KLIBANOV, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 1-28, 1983.

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

LEHNINGER, A. **Componentes moleculares das células**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1976. 262p.

LENINGHER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIN, Y. H.; HAUNG, H. C. Lipase in the lipid bodies of corn scutella during seedling growth. **Plant Physiology**, v.73, p.460-463, 1983.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. v.3, 2001.

LJIMA, N.; TANAKA, S.; OTA, Y. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.18, p.59-69, 1998.

MALCATA, F. X. et al. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.67, n.12, p.890-910, 1990.

MARTINS, M. T. C. S. et al. Composição química de sementes de espécies de *Manihot* Mill (*Euphorbiaceae*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.621-623, 2007.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1451-1463, 2007.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. p.194. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, A. A. et al. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**. n.40, p.325-438, 2001.

NANDANAN, M. D.; SEHGAL, S. S.; AGARWAL, H. C. Properties and distribution of extra-digestive lipase in the beetle, trogoderma. **Insect Biochemistry**, v.3, p.223-230, 1973.

NCUBE, I. et al. Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis* seed. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1257, p.149-156, 1995.

NEDEL, J. L. **Fundamentos da Qualidade de Sementes**. In: Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos. 1. Ed. Pelotas, 2003. p.118-123.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, 1274p.

OLIVEIRA, P. C. et al. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v.23, n.5, p.632-636, 2000.

PAHOJA, V. M.; SETHAR, M. A. A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. **Pakistan Journal of Applied Sciences**,v.2, n.4, p.474-484, 2002.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. n.27, p.187-204, 2000.

PALEKAR, A.A.; VASUDEVAN, P.T., YAN, S. Purification of Lipase: a Review. **Biocatalysis Biotransformation**. v. 18, p. 177-200, 2000.

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

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

PAULA, A.V. **Seleção de preparações comerciais de lipase para interesterificação da gordura do leite com óleo de soja**. 2008. p.110. Dissertação, Engenharia Química – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

PÉREZ, C. R.; DEL TORO, A. N.; CARRENO, F. G. Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.158, p.99-105, 2011.

Perfumer & Flavorist. Next: First-person takes on F&F's past, present and future. | v. 35: pg. 22-27, 2010.

PERNA, R. F. **Imobilização das enzimas ciclodextrina-glicosil-transferase e lipase pelos métodos sol-gel e multipontual**. 2007. p.23. Relatório final de projeto de iniciação científica. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

POLIZELLI, P.P. **Caracterização bioquímica de lipase extraída de sementes oleaginosas de *Pachira aquática***. 2008. p.126. Tese – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

PRABHU, A. V et al.. Rice bran lipase: Extraction, activity, and stability. **American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers**. v.15, p.1083-1089, 1999.

QUETTIER, A. L.; EASTMOND, P. J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, p.485-490, 2009.

RANGANATHAN. S. V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.147-148, p.237-250, 2009.

RIBLETT, A.L. et al. Characterization of B-conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p.4983-4989, 2001.

SAAD, E, B. **Etanolise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos**. 2005. p.99. Dissertação – Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SAGIROGLU, A.; ARABACI, N. Sunflower seed lipase: Extration, purification, and characterization. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v.35, p. 37-51, 2005.

SANA, N. K. et al. Idetentificaion, Purification and characterization of lipase from germinating oil seeds (*Brassica napus L.*). **Pakistan Journal of Biological Sciences**. n.7, v.2, p.246-252, 2004.

SANTOS, N. J. M. C. O. et al. Ultrafiltração tangencial como ferramenta no estudo da distribuição de contaminantes em sistemas aquáticos. **Revista Virtual de Química**, v.3, p.68-77, 2011.

SANZ, L. C.; OLIAS, J. M. Characterization of lupin seed lipase, **Food Chemistry**, v.37, p.221-228, 1990.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p.1-18, 2003.

SEBRAE, 2008. Biodiesel. Disponível em:

www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha_Sebrae.pdf. Acesso em 08/10/2010.

SECUNDO, F. et al. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, n. 1-3, p. 350-361, 2008.

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

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological approach of microbial lipase: A Review. **Biotechnology**, n.10, v.1, p.23-40, 2011.

SIGMA-ALDRICH. Triton® X-100 non-ionic detergent. Acessado em 18-06-2012

SOARES, C. M. F. **Encapsulação da enzima lipase em matrizes sol-gel e sua aplicação em reações de hidrólise e esterificação**. 2004. p.213. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-79, p.745-757, 1999.

SUAREZ, P. A. Z. et al. Bicombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 768-775, 2009.

SUZUKI, T.; HONDA, Y.; MUKASA, Y. Purification and characterization of lipase in buckwheat seed. **Agricultural and Food Chemistry**. v.52, p.7407-7411, 2004.

TANI, H.; OHISHI, H.; WATANABE, K. Purification and characterization of proteinous inhibitor of lipase from wheat flour. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.42, p.2382-2385, 1994.

TANI, K.; SUZUKI, Y. Influence of titania matrix on retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, p.129-134, 1996.

TING, W. J. et al. 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.

TIOSSO, P. C. **Transesterificação de triglicerídeos de fonte vegetal e animal catalisada por preparações comerciais de lipase imobilizada na presença de etanol visando a produção de biodiesel**. 2010. p.74. Dissertação – Centro de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseada em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v.25, n.4, p.616-623, 2002.

URQUHART et al. Lipase activity in oats during grain maturation and germination. **Cereal Chemistry**, v.61, n.2, p.105-108, 1984.

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

VILLENEUVE, P. et al. 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.

VITOLO, M. **Imobilização de enzimas**. In LIMA et al. (Eds), *Biotechnologia industrial – Processos fermentativos e enzimáticos*, v. 3, São Paulo: Blucher, 2001.

VOLPATO, G. **Produção, purificação e imobilização de lipases *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol**. 2009. p.147. Tese, Engenharia Química Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

WANG, S. M.; LIN, Y. H.; HUANG, A. H. C. Lipase activities in scutella of maize lines having diverse kernel lipid content. **Plant Physiology**, v.76, p.837-839, 1984.

WEERASOORIYA, M. K. B.; GUNASEKARA, Q. S. W. Partially purified rubber seed lipase for efficient removal of fatty soil. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v.39, p.69-76, 2011.

Web of Knowledge. Disponível em <
http://apps.webofknowledge.com/UA_GeneralSearch_input.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&SID=1E8mKoOp7L33io9LgiN&preferencesSaved= >. Acesso em:
09/02/2012.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.

WOLF, W. J. Soybean proteins: Their functional, chemical and physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 969-976, 1970.

YEŞİLOĞLU, Y.; BAŞKURT, L. Partial purification and characterization of almond seed lipase. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**. v.38, p.397-410, 2008.

YEŞİLOĞLU, Y.; DEMIRKAN, B. Biocatalytic Properties of Lipase from Walnut Seed (*Juglans regia L.*). **Journal of the American oil Chemists' Society**. v.87, p.659-665, 2010.

ZANIN, G.M., MORAES, F.F., Enzimas imobilizadas. In: SAID, S. e PIETRO, R.C.L. (Eds). **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Ribeirão Preto, Legis Summa, cap, 4, p.413, 2004.

ZOUARI, N. et al. Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: The scorpion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1726, p.67-74, 2005.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Lipases de origem vegetal

| Origem | Massa Molecular (kDa) | pH Ótimo | T °C Ótima | Referência |
|--|-----------------------------|--------------|---------------|-----------------------------|
| Semente de Feijões Africanos (<i>Pentaclethra macrophylla Benth</i>) | - | 8,0 | 30 | ENUJIUGHA et al., 2004. |
| Sementes de Mamona Chinesa (várias variedades) | 60 | 4,6 | 35 | ER-ZHENG et al., 2010. |
| Farelo de Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | 9,4 | 11 | 80 | BHARDWAJ et al., 2001. |
| Semente de Nogueira (<i>Juglans regia L.</i>) | - | 9,0 | 70 | YEŞILOĞLU e DEMIRKAN, 2010. |
| Semente de Girasol (<i>Helianthus annuus L.</i>) | 22 | 7,5 | 50 | SAGIROGLU e ARABACI, 2005. |
| Semente de Coco (<i>Cocos nucifera linn</i>) | - | 7,5 – 8,5 | 35 | EJEDEGBA et al., 2007. |
| Mudas de milho durante o crescimento (várias variedades) | - | 7,5 | - | LIN et al., 1983. |
| Semente de <i>Vernonia galamensis</i> | 116 – 30 | - | - | NCUBE et al., 1995. |
| Semente de louro (<i>Laurus nobilis L.</i>) | - | 8,0 | 50 | ISBILIR et al., 2008. |

Apêndice 1 - Lipases de origem vegetal (Continuação)

| Origem | Massa Molecular (kDa) | pH Ótimo | T °C Ótima | Referência |
|---|-----------------------------|-------------|---------------|--|
| Germem de trigo (<i>Triticum aestivum L.</i>) | 143 | 8,0 | 37 | KAPRANCHIKOV et al., 2004. |
| Semente de <i>Jatropha curcas L</i> (Pinhão manso) | - | 7,5 | 37 | ABIGOR et al., 2002. |
| Semente de Trigo (<i>Fagopyrum esculentum</i>) (Lipase I) | 150 | 3,0 | 30 | SUZUKI et al., 2004. |
| Semente de Trigo (Lipase II) | 28,4 | 6,0 | 40 | SUZUKI et al., 2004 |
| Flor de Trigo | 25 | - | - | TANI et al., 1994. |
| Semente de <i>Pachira aquatica</i> (Bombacaceae) | 55 | 8,0 | 40 | POLIZELLI, 2008. |
| Semente de Mamona (<i>Ricinus communis</i>) | 60 | 4,5 | - | EASMOND, 2004. |
| Semente de <i>Brassica Napus L.</i> | 34 | 7,0 | 37 | SANA et al., 2004. |
| Semente de <i>Hevea. brasiliensis</i> | - | 8,0 | 40 | WEERASOORIYA e GUNASEKARA, 2011. |
| Semente de Tremoço (<i>Lupinus albus cv multotupa</i>) | - | 5,0 | 25 | SANZ e OLIAS, 1990. |
| Semente de Amêndoas (<i>Amygdalus communis L.</i>) | - | 8,5 | 65 | YEŞİLOĞLU e BAŞKURT, 2008. |

Apêndice 2 - Lipases obtidas a partir de animais

| Origem | Massa Molecular (kDa) | pH Ótimo | T °C Ótima | Referência |
|----------------------|------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|
| Inseto | 76 | - | - | ARRESE e WELLS, 1994. |
| Besouro | - | 7,6 | 37 | NANDANAN et al., 1973. |
| eCordeiro | 68 | 6 | 30 | D'SOUZA e ORIEL, 1992. |
| Leite de vaca | 62-68 | - | - | EGELRUD e OLIVECRONA, 1972. |
| Camarão | Dois monômeros: 95 / 63 | 8-10 | 30-40 | PÉREZ et al., 2011. |
| Peixe | 64 | 7-9 | - | LIJIMA et al., 1998. |
| Escorpião | 50 | 9 | - | ZOUARI et al. 2005 |

ANEXOS

Anexo 1 - Lipases obtidas a partir de fungos

| Origem | Massa Molecular (kDa) | pH Ótimo | T °C Ótima | Referência |
|---------------------------------------|--------------------------|-------------|---------------|--|
| <i>Arxulaadeninivorans</i> | 50 | 7,5 | 30 | Boer et al. (2005) |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 36082 | 38 | - | - | Fu et al. (1997) Hube et al. (2000) |
| <i>Candida curvata</i> | 195 | 5,0-8,0 | 60 | Lazar and Schroder (1992) |
| <i>Candida rugosa</i> ATCC 14380 | 60 | 5,0 | - | Lotti et al. (1993) |
| <i>Candida rugosa</i> DMS 2031 (A) | 64 | 7,8 | - | Benjamin and Pandey (2001) |
| <i>Candida rugosa</i> DMS 2031 (B) | 62 | 7,8 | - | Benjamin and Pandey (2001) |
| <i>Candida rugosa</i> DMS 2031 (C) | 60 | 7,8 | - | Benjamin and Pandey (2001) |
| <i>Geotrichum candidum</i> link | 55 | 5,6-7,0 | 40 | Tsujisaka et al. (1973) |
| <i>Humicola lanuginosa</i> | 27,5 | 8,0 | 60 | Veeraragavan et al. (1990) |
| <i>Mucor michei</i> | - | 8,0 | 40 | Lazar and Schroder (1992) |
| <i>Penicillium cyclopium</i> (A) | 27 | 7,5 | 35 | Iwai et al. (1975) |
| <i>Penicillium cyclopium</i> (B) | 36 | 5,8 | 40 | Iwai et al. (1975) |
| <i>Rhizopus arrhizus</i> | 43 | 8,0 | - | Lazar and Schroder (1992) |
| <i>Rhizopus delemar</i> | 41 | 5,6 | 35 | Lazar and Schroder (1992) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 63 | - | - | Oishi et al. (1999) |
| <i>Trichosporon asteroides</i> | 37 | 5,0 | 50 | Dharmsthiti and Ammaranond (1997) |

Fonte: Adaptado de SHARMA, D; SHARMA, B.; SHUKLA, 2011.

Anexo 2 - Lipases obtidas a partir de bactérias

| Origem | Massa Molecular (kDa) | pH Ótimo | T °C Ótima | Referência |
|----------------------------------|-----------------------|----------|------------|---|
| <i>Acinetobacter</i> sp. RAG-1 | 33 | - | - | Snellman et al. (2002) |
| <i>Bacillus</i> sp. | 22 | - | - | Sugihara et al. (1991) |
| <i>Bacillus</i> sp. | 45 | - | - | Nawani and Kaur (2000) |
| <i>Bacillus</i> sp. Strain398 | 50 | - | - | Kim et al. (1994) |
| <i>Bacillus</i> sp. THLO27 | 69 | - | - | Dharmsthiti and Luchai (1999) |
| <i>B. subtilis</i> 168 | 19 | - | - | Lesuisse et al. (1993) |
| <i>Burkholderia</i> sp. | 30 | - | - | Rathi et al. 2000, 2001; Bradoo et al. (2002) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. KWI-56 | 33 | - | - | Brune and Gots (1992) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. (PSL) | 30 | - | - | Dong et al (1999) |
| <i>P. aeruginosa</i> EF2 | 29 | - | - | Gilbert et al. (1991) |
| <i>P. fluerescens</i> MC50 | 55 | - | - | Brune and Gots (1992) |
| <i>P. mendocina</i> 3121-1 | 62 | - | - | Surinenaite et al. (2002) |
| <i>P.pseudoalcaligenes</i> F-111 | 32 | - | - | Lin et al (1996). |
| <i>Serratia marcescens</i> | 52 | - | - | Abdou (2003) |
| <i>S. hyicus</i> | 46 | - | - | Simous et al. (1996) |
| <i>S. haemolyticus</i> | 45 | - | - | Oh et al. (1999) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 46 | - | - | PAIVA, BALCÃO e MALCATA. (2000) |

Fonte: Adaptado de SHARMA, D; SHARMA, B.; SHUKLA, 2011.