

UNIVERSIDADE REGIONAL DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE COMERCIAL DE
PÂNCREAS SUÍNO EM DIFERENTES SUPORTES INORGÂNICOS

ROBISON PAULO SCHERER

ERECHIM, RS - BRASIL

SETEMBRO DE 2010

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE COMERCIAL DE
PÂNCREAS SUÍNO EM DIFERENTES SUPORTES INORGÂNICOS**

ROBISON PAULO SCHERER

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

SETEMBRO DE 2010

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE COMERCIAL DE PÂNCREAS SUÍNO EM DIFERENTES SUPORTES INORGÂNICOS

ROBISON PAULO SCHERER

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Dra. Debóra de Oliveira
Orientadora

Prof^a. Dra. Sibeles Berenice Castellã Pergher
Orientadora

Prof^a. Dra. Kátia Bernardo Gusmão
IQ/UFRGS

Prof^a. Dra. Helen Treichel
URI-Campus de Erechim

Erechim, 01 de Setembro de 2010

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Theobaldo e Gilce e minha querida irmã Katlin que sempre estiveram junto de mim, me apoiando em todos os sentidos nas horas que precisei, dando-me sempre atenção e incentivo para realização deste trabalho.

A vocês a minha eterna gratidão por tudo.

AGRADECIMENTOS

As minhas queridas orientadoras, Profa. Débora de Oliveira e Profa. Sibeles Pergher pela confiança, carinho, amizade e pelo apoio nos momentos difíceis que passei.

Acima de tudo meus mais sinceros agradecimentos a vocês duas pela inestimável paciência em se dispor a compartilharem comigo parte de seus conhecimentos, que por muitas vezes tornaram-se as respostas de minhas dúvidas. Agradecer por tudo que fizeram por mim... sem o apoio, carinho e incentivo de vocês este trabalho não estaria concluído. Seus ensinamentos me mostraram um caminho a seguir, vou levá-las no coração e com certeza terão para sempre o meu carinho, estima e amizade.

Meus agradecimentos aos professores do Curso de Engenharia de Alimentos e Química, especialmente às professoras Helen Treichel, Eunice Valduga, Geciane Toniazzo e Natalia Paroul.

Aos professores José Vladimir de Oliveira, Rogério Cansian, Rogério Dallago e Marco Di Luccio, pelos bons momentos compartilhados, pelos ensinamentos e acima de tudo pela amizade de todos.

Aos meus queridos amigos e estimados colegas, em especial Alessandra Smaniotto, Daiane Boschetto, Graciele Kuhn, Juliana Quia Silva, Marcell Fernandes, Claudia Trentin e Silvana Menoncin pelas idéias, incentivo, ajuda e principalmente pela amizade.

Enfim a todos que por ventura não foram citados, mas que de uma forma ou outra tornaram possível a realização deste trabalho.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. Viver sem medo de novas descobertas, lutar por um objetivo... É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte”

Albert Einstein

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE COMERCIAL DE PÂNCREAS SUÍNO EM DIFERENTES SUPORTES INORGÂNICOS

ROBISON PAULO SCHERER

Setembro/2010

Orientadoras: Débora de Oliveira
Sibele Berenice Castellã Pergher

Apesar do potencial de aplicação das lipases como biocatalisadores em reações de interesse, o alto custo para aplicação em processos industriais está principalmente relacionado à baixa estabilidade destes catalisadores em condições adversas. A imobilização de biocatalisadores em suportes inertes pode assegurar seu uso em diversas bateladas, resultando em economia para processos industriais. No entanto, a imobilização de lipases é ainda um desafio complexo, uma vez que a eficiência do processo depende da estrutura da enzima, do método de imobilização e do tipo de suporte. Tendo em vista estes aspectos, o objetivo principal deste trabalho foi realizar a seleção de um suporte aceitável para imobilização de lipase de pâncreas de porco. Os suportes pré-selecionados em termos de rendimento de imobilização, percentual de retenção e atividade enzimática foram utilizados na etapa de otimização das condições de imobilização. Vinte e cinco suportes inorgânicos foram inicialmente testados e os que conduziram à melhores resultados em termos de rendimento de imobilização e atividade de esterificação da enzima imobilizada, foram submetidos a processo de otimização, avaliando o efeito do tempo de imobilização e da relação mássica enzima:suporte na resposta da imobilização da lipase. Maiores rendimentos de imobilização (38,23%) foram obtidos quando a argila Poço A pilarizada foi utilizada como suporte, em 120 minutos de imobilização e relação enzima:suporte de 2:0,5. As maiores atividades de esterificação (250,56U/g) foram alcançadas utilizando a argila Poço A como suporte, após 180 minutos de imobilização e relação enzima:suporte de 2:1. A caracterização dos suportes, enzima livre e imobilizada nos suportes através de Difração em Raio-X, Microscopia Eletrônica de Varredura, Área Superficial e Diâmetro de Poro permitiram visualizar as diferenças no processo devido à imobilização da enzima nos diferentes suportes.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

STUDY OF THE IMMOBILIZATION OF COMMERCIAL PORCINE PANCREATIC LIPASE ON DIFFERENT INORGANIC SUPPORTS

ROBISON PAULO SCHERER

September/2010

Advisors: Débora de Oliveira
 Sibele Berenice Castellã Pergher

Besides the potential of lipases as biocatalysts of reactions of interest, the high cost for application in industrial processes is related to their reduced stability under adverse conditions. The immobilization of biocatalysts in inert supports can ensure the use for several batches, resulting in economy for industrial processes. The higher contribution for the good performance of immobilized catalyst is furnished by the strategy of immobilization employed and by the support. However, the immobilization of lipases is still a complex challenge, since the efficiency of the process depends on the structure of the enzyme, the method of immobilization and the type of support. Taking into account these aspects, the main objective of this work was the screening of a suitable support for immobilization of commercial porcine pancreatic lipase. The pre-selected supports in terms of yield of immobilization and enzymatic activity were used in the step of optimization of immobilization process. Twenty-five inorganic supports were initially tested and those that led to better results were submitted to the optimization of immobilization process, evaluating the effect of immobilization time and enzyme to support mass ratio on the lipase immobilization response. Higher immobilization yields (38.23%) were obtained for clay montmorillonite pillared, after 120 minutes of immobilization and enzyme to support mass ratio of 2:0.5. The highest esterification activities (250.56U/g) were achieved using the clay montmorillonite as support, after 180 minutes of immobilization and enzyme to support mass ratio of 2:1. The characterization of the supports, free enzyme and immobilized enzyme on different supports by X-Ray Diffraction, Superficial Area, Pore Diameter and Scanning Electron Microscopy permitted well visualize the differences on the immobilization process using the different supports.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>4</u>
2.1 ENZIMAS	4
2.1 LIPASES	6
2.2 LIPASE DE PÂNCREAS SUÍNO	7
2.3 APLICAÇÕES DE LIPASES COMERCIAIS.....	8
2.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	10
2.5 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES.....	14
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
<u>3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</u>	<u>22</u>
3.1 ENZIMA.....	22
3.2 SUPORTES.....	22
3.3 EQUIPAMENTOS.....	23
3.4 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE COMERCIAL NOS DIFERENTES SUPORTES.....	24
3.5 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO	24
3.6 MÉTODOS EMPREGADOS DURANTE O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO.....	25
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS	25
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO	26
DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO.....	27
3.7 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES E ENZIMAS IMOBILIZADAS	27
DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	28

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	28
ANÁLISE TEXTURAL POR ADSORÇÃO DE N ₂	28
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 ARGILAS.....	30
4.1.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ARGILAS UTILIZADAS NA ETAPA DE <i>SCREENING</i>	30
4.1.2 RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NAS ARGILAS.....	34
.....	35
4.1.3 ATIVIDADE CATALÍTICA DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM ARGILAS.....	38
4.2 ZEÓLITAS.....	39
4.2.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ZEÓLITAS UTILIZADAS NA ETAPA DE <i>SCREENING</i>	39
4.2.2 RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NAS ZEÓLITAS	42
4.2.3 ATIVIDADE CATALÍTICA DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM ZEÓLITAS	46
4.3 RESINAS DE TROCA IÔNICA	47
4.3.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS RESINAS UTILIZADAS NA ETAPA DE <i>SCREENING</i>	47
4.3.2 RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NAS RESINAS DE TROCA IÔNICA	49
4.3.3 ATIVIDADE CATALÍTICA DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM RESINAS DE TROCA IÔNICA	52
4.4 ÓXIDOS E ZEÓLITA MCM-22	53
4.4.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ALUMINAS E ZEÓLITA MCM-22 UTILIZADAS NA ETAPA DE <i>SCREENING</i>	53
4.4.2 RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NAS ALUMINAS E ZEÓLITA MCM-22.....	55
4.4.3 ATIVIDADE CATALÍTICA DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM ALUMINAS E ZEÓLITA MCM22	58
4.5 RESINAS POLIMÉRICAS.....	60
4.5.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS RESINAS POLIMÉRICAS UTILIZADAS NA ETAPA DE <i>SCREENING</i>	60
4.5.2 RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NAS RESINAS POLIMÉRICAS.....	62
4.5.3 ATIVIDADE CATALÍTICA DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM RESINAS POLIMÉRICAS.....	65
4.6 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO	66
4.6.1 OTIMIZAÇÃO DE VARIÁVEIS DOS SUPORTES SELECIONADOS.....	68
<i>RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NAS ARGILAS EM DIFERENTES TEMPOS E RELAÇÕES ENZIMA:SUPORTE</i>	68
<i>ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA NAS ARGILAS EM DIFERENTES TEMPOS E RELAÇÕES</i>	
<i>ENZIMA/SUPORTE.....</i>	75

4.6.2 COMPARAÇÃO ENTRE O RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO E A ATIVIDADE CATALÍTICA DA LIPASE IMOBILIZADA NAS DIFERENTES ARGILAS	77
4.6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES PRÉ-SELECIONADOS: ARGILA MONTMORILLONITA KSF, ARGILA MONTMORILLONITA NATURAL POÇO A E ARGILA MONTMORILLONITA POÇO A PILARIZADA	78
<i>ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO</i>	80
<i>ANÁLISE TEXTURAL POR ADSORÇÃO DE N₂</i>	81
<i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA</i>	82
<i>DIFRAÇÃO DE RAIO-X</i>	86
<u>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES</u>	90
5.1 CONCLUSÕES	90
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	92

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 Reações catalisadas por lipases. Adaptado de Paques e Macedo (2006).</i>	7
<i>Figura 2. Difratoograma de raios-X das argilas comerciais KSF e K-10.</i>	31
<i>Figura 3 Difratoograma de raios-X do caulim (Reagen) e caulim mina 1CR.</i>	32
<i>Figura 4. Difratoograma de raios-X argilas Poço A e Poço A Pilarizada.(PILC).</i>	33
<i>Figura 5 Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em argilas.</i>	34
<i>Figura 6. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em argilas, antes e após o processo de imobilização.</i>	35
<i>Figura 7. Difratoograma de raios-X das zeólitas Y, ZSM-22, ZSM-35, NaX, ZSM-5, ITQ-2 e Mordenita.</i>	41
<i>Figura 8. Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em zeólitas.</i>	43
<i>Figura 9. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em zeólitas, antes e após o processo de imobilização.</i>	43
<i>Figura 10. Difratoograma de raios-X das resinas de troca iônica Amberlite XAD-2 e Amberlyst-36.</i>	48
<i>Figura 11. Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em resinas de troca iônica.</i>	50
<i>Figura 12. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em resinas de troca iônica antes e após o processo de imobilização.</i>	50
<i>Figura 13. Difratoograma de raios-X das aluminas neutra, básica e ácida e das Zeólitas MCM-22 Si/Al (15, 25 e 50).</i>	54
<i>Figura 14. Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em aluminas e zeólita MCM-22.</i>	56
<i>Figura 15. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em aluminas e zeólita MCM-22, antes e após o processo de imobilização.</i>	56
<i>Figura 16. Esquema de imobilização de lipases por adsorção em materiais mesoporosos. (Dumitriu et al., 2003).</i>	58
<i>Figura 17. Difratoograma de raios-X das resinas poliméricas Accurel XP100, MP100, XP200 e MP1000.</i>	61
<i>Figura 18. Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em resinas poliméricas.</i>	62
<i>Figura 19. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em resinas poliméricas, antes e após o processo de imobilização.</i>	63
<i>Figura 20. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte de 2:1.</i>	69
<i>Figura 21. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte de 2:0,5.</i>	71
<i>Figura 22. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte de 2:2.</i>	72
<i>Figura 23. Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte 2:1.</i>	75

<i>Figura 24. Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte 2:0,5.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 25. Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte 2:2.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 26. Espectros de infravermelho da lipase livre, do suporte Argila Poço A calcinada e pilarizada e da lipase imobilizada neste suporte por 60 minutos e razão mássica enzima:suporte de 2:2.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 27. Micrografia da lipase livre de pâncreas suíno.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 28. Micrografia da Argila montmorillonita comercial KSF.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 29. Micrografia da lipase imobilizada em argila montmorillonita comercial KSF, após 180 minutos de imobilização, utilizando razão mássica enzima:suporte de 2:2.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 30. Micrografia da Argila montmorillonita natural Poço A.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 31. Micrografia da lipase imobilizada em argila montmorillonita natural Poço A após 180 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:1.</i>	<i>85</i>
<i>Figura 32. Micrografia da argila montmorillonita Poço A calcinada e pilarizada.</i>	<i>85</i>
<i>.Figura 33. Micrografia da lipase Imobilizada em argila montmorillonita Poço A calcinada e pilarizada, após 60 minutos de imobilização, utilizando razão mássica enzima:suporte de 2:2.</i>	<i>86</i>
<i>Figura 34. Difractogramas de Raios-X da lipase livre, da argila montmorillonita KSF comercial e da lipase imobilizada em argila montmorillonita comercial KSF após 180 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:2.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 35. Difractogramas de Raios-X da lipase livre, argila montmorillonita Poço A natural e lipase imobilizada em argila montmorillonita natural Poço A após 180 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:1.</i>	<i>88</i>
<i>Figura 36. Difractogramas de Raios-X da lipase livre, argila montmorillonita Poço A calcinada e pilarizada e lipase imobilizada em argila montmorillonita Poço A calcinada e pilarizada após 60 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:2.</i>	<i>88</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Exemplos de aplicações industriais de lipase. Adaptado de Paques e Macedo (2006).</i>	9
<i>Tabela 2. Lipases e suportes utilizados no processo de imobilização das enzimas.</i>	19
<i>Tabela 3. Área superficial específica das argilas comerciais KSF e K-10.</i>	31
<i>Tabela 4. Área superficial específica dos caulims Mina 1CR e Reagen.</i>	32
<i>Tabela 5. Área superficial específica das argilas Poço A e Poço A Pilarizada.</i>	34
<i>Tabela 6. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas.</i>	36
<i>Tabela 7. Atividade de esterificação da lipase comercial de pâncreas suíno na forma livre e imobilizada em argilas.</i>	38
<i>Tabela 8. Área superficial específica, diâmetro de poros e tipo de estrutura das zeólitas Y, ZSM-22, ZSM-35, ZSM-5, NaX, ITQ-2 e Mordenita.</i>	42
<i>Tabela 9. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas zeólitas.</i>	44
<i>Tabela 10. Atividade de esterificação da lipase comercial obtida de pâncreas suíno livre e imobilizada em zeólitas.</i>	47
<i>Tabela 11. Área superficial específica das resinas de troca iônica Amberlyst 36 e Amberlite XAD-2.</i>	49
<i>Tabela 12. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas resinas.</i>	51
<i>Tabela 13. Atividade de esterificação da lipase comercial obtida de pâncreas suíno livre e imobilizada em resinas de troca iônica.</i>	52
<i>Tabela 14. Área superficial específica das aluminas ácida, básica e neutra e das zeólitas MCM-22 com diferentes relações Si/Al (1:15, 1:25 e 1:50).</i>	55
<i>Tabela 15. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas aluminas e zeólita MCM-22.</i>	57
<i>Tabela 16. Atividade de esterificação da lipase comercial obtida de pâncreas suíno livre e imobilizada em aluminas ativadas ácida, básica e neutra e zeólita MCM-22 com diferentes relações Si/Al.</i>	59
<i>Tabela 17. Área superficial específica das resinas poliméricas Accurel XP100, MP100, XP200 e MP1000.</i>	61
<i>Tabela 18. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas resinas poliméricas.</i>	63
<i>Tabela 19. Atividade de esterificação da lipase comercial obtida de pâncreas suíno livre e imobilizada em resinas poliméricas.</i>	65
<i>Tabela 20. Rendimento de imobilização X Atividade de esterificação – Etapa de screening de suportes para imobilização da lipase de pâncreas de porco.</i>	67
<i>Tabela 21. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização, utilizando relação enzima:suporte de 2:1.</i>	69

<i>Tabela 22. Quantidade de proteína adsorvida , rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização, utilizando relação enzima:suporte de 2:0,5.</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 23. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos relação 2:2.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 24. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização e relações enzima:suporte.</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 25. Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização e relações enzima:suporte.</i>	<i>77</i>
<i>Tabela 26. Rendimento de imobilização versus Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização e relações enzima:suporte.</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 27. Área superficial específica (BET) para as amostras de argilas (KSF, Poço A natural, Poço A calcinada e pilarizada) e lipase livre e imobilizada.</i>	<i>81</i>

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são um tipo especial de proteínas produzidas dentro das células dos organismos vivos que apresentam atividade catalítica. A aplicação industrial de enzimas tem sido impulsionada com o aumento da preocupação com as questões ambientais, com a qualidade do produto e com a redução dos gastos em setores industriais. Atualmente a tecnologia enzimática é uma alternativa para substituir processos químicos por processos biocatalisados, uma vez que estes últimos possuem menor impacto ambiental e são mais limpos.

A biocatálise e a tecnologia enzimática são ferramentas promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado. As lipases destacam-se entre as principais enzimas utilizadas em biocatálise, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio-regio e enantiosseletividade (Hasan et al., 2006, Krieger et al., 2004).

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas cuja função principal é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa de interface água-lipídios. Na área de química orgânica, as lipases são bem conhecidas e atraentes entre os biocatalisadores mais amplamente utilizados, pois podem catalisar várias reações em meios não aquosos, tais como esterificação e transesterificação (Haki e Rakshit, 2003; Reetz, 2002; Silva et al., 2001). A capacidade para executar a reação de síntese de ácidos graxos e álcoois tornou estes catalisadores amplamente utilizados para produzir tais compostos (Abbas e Comeau, 2003; Treichel et al., 2010; Sun e Xu, 2008). Há um interesse crescente no desenvolvimento de aplicações de lipases em transformações oleoquímicas visando à obtenção de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, como os ésteres de ácidos graxos monoalquil. A utilização de lipases como catalisadores para a produção de biodiesel, definido como uma mistura de ésteres de polietilenoglicol é uma tecnologia limpa devido a sua atoxicidade que exige condições de funcionamento suaves comparado com o método químico (Dutra et al., 2008).

As enzimas lipolíticas são produzidas por animais, plantas e micro-organismos (Treichel et al., 2010; Dutra et al., 2008). Estes biocatalisadores são encontrados em plantas, exemplo da espécie *Vernonia galamensis* (Ncube e Read, 1995), no pâncreas suíno, além de serem produzidas por muitos micro-organismos, tais como, *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, etc. A lipase pancreática pertence ao grupo das éster-hidrolases que atuam preferencialmente em triglicerídeos insolúveis em água nas emulsões em micelas e em filmes monomoleculares. Além disso, a lipase proveniente de pâncreas suíno apresenta a característica de ser ativa em interfaces, conferindo à mesma a possibilidade de utilização em inúmeros processos industriais.

Apesar do potencial de aplicação das lipases como biocatalisadores em reações de interesse, o alto custo para aplicação em processos industriais está principalmente relacionado à baixa estabilidade destes catalisadores em condições adversas. A estabilização das enzimas consiste em um processo desejável do ponto de vista econômico. Enzimas na forma solúvel podem perder sua capacidade catalítica em uma batelada, tornando difícil seu reuso. Além disso, a presença de enzima residual no meio reacional pode se constituir em contaminação indesejável (Villeneuve et al., 2000; Sebrão et al., 2007; Dumitriu et al., 2003). A imobilização de biocatalisadores em suportes inertes (sem dano à atividade enzimática) pode assegurar seu uso em diversas bateladas, resultando em economia para processos industriais (Dalla-Vecchia et al., 2004). As principais vantagens das enzimas imobilizadas são relacionadas às suas maiores estabilidades e facilidade de separação do meio reacional (Bon et al., 2008).

A maior contribuição para o bom desempenho de enzimas imobilizadas está relacionada à estratégia de imobilização empregada (Cárdias et al., 1999) e pelo suporte. O *screening* do suporte mais apropriado pode contribuir para o aumento do tempo de meia-vida da enzima e também para o desempenho global do processo (Gomes et al., 2006). A imobilização de lipases é ainda um desafio complexo, uma vez que a eficiência do processo depende da estrutura da enzima, do método de imobilização e do tipo de suporte (Oliveira et al., 2000).

Vários estudos mostram que vários suportes orgânicos, inorgânicos e materiais naturais, com diferentes características, têm sido utilizados para a

imobilização de lipases (Dalla Vecchia et al., 2004; Dumitriu et al., 2003; Villeneuve et.al., 2000). Uma série de trabalhos aponta o uso de suportes inorgânicos porosos de alto custo devido às suas características de resistência mecânica e área superficial (Hernández-Jústiz et al., 1998; Gomes et al., 2006). O emprego de suportes de baixo custo que apresentam superfície interna ativada e hidrofóbica pode ser reconhecido como potencial para uso em imobilização de lipases em nível molecular como interfaces sólidas. O uso de suportes hidrofóbicos é preferível para imobilização de lipases uma vez que eles apresentam baixa tendência de competir com a água disponível no meio reacional, necessária para manutenção da atividade enzimática (Villeneuve et al., 2000).

Levando em consideração estes aspectos, a imobilização de lipases pode ser realizada tanto por adsorção física como por ligação química, utilizando polímeros naturais ou sintéticos como suportes (Takabashi et al., 2000; Fuentes et al., 2001; Yiu et al., 2001; Corma et al., 2001) ou materiais inorgânicos como terra diatomácea (Celite), vidros com diâmetro de poro controlado, sílica, zeólitas, filosilicatos, óxidos meso-estruturados, cerâmicas, matrizes inorgânicas baseadas em processos de sol-gel ou microemulsões (Dumitriu et al., 2003).

Tendo em vista os aspectos mencionados anteriormente, o objetivo principal deste trabalho foi realizar a seleção de um suporte aceitável para imobilização de lipase de pâncreas de porco. Os suportes pré-selecionados em termos de rendimento de imobilização, percentual de retenção e atividade enzimática foram utilizados na etapa de otimização das condições de imobilização, visando à obtenção de dados satisfatórios em termos de processo de imobilização através do emprego de suportes de baixo custo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão da literatura referente à definição, aplicações industriais, histórico, técnicas e importância de imobilização, além de tipos de suportes empregados em estudos de imobilização de lipases tendo com isso por objetivo fundamentar a pesquisa em imobilização de uma lipase comercial empregando diferentes suportes inorgânicos.

2.1 Enzimas

Há várias décadas a pesquisa em enzimas vem sendo destacada em estudos bioquímicos. Foi James Sumner's um dos primeiros pioneiros nesta pesquisa em 1926 a isolar e cristalizar a primeira enzima catalisando reações de hidrólise.

As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em micro-organismos. Todas as enzimas são proteínas tendo como papel funcional catalisar reações em micro-organismos bem como aumentar a velocidade de uma reação química por um fator de 10^{14} vezes mais do que uma reação não catalisada (Voet et al., 2000).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores em diversas reações de biotransformações, sendo consideradas versáteis biocatalisadores, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica. Além disso, os biocatalisadores destacam-se por acelerar a velocidade de uma reação, apresentar compatibilidade com substratos sintéticos, utilização em condições brandas, podendo em alguns casos catalisar reações nos dois sentidos, além de apresentar seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (Faber, 2000).

Entretanto, quando a permeabilidade da membrana celular é insuficiente para a passagem do substrato ou quando ocorrem reações laterais indesejáveis, é necessário conduzir a biotransformação com enzimas isoladas ou purificadas.

No ano de 2002 mais de 3.000 diferentes enzimas haviam sido identificadas e muitas isoladas em sua forma pura, porém estudos apontam que cerca de 4000

enzimas são conhecidas, e destas, cerca de apenas 200 são utilizadas comercialmente (Sharma et al., 2001; Dalla Vecchia et al., 2004).

Desta forma, a pesquisa em catalisadores biológicos tornou possível o uso de enzimas com maiores aplicabilidades e adaptadas às diferentes condições de processo, permitindo seu uso expansivo em diversos setores industriais, entre eles: indústria farmacêutica, produtos agroquímicos, oleoquímica, indústria de alimentos, detergentes, entre outras. O resultado é a possibilidade de uma indústria altamente diversificada na aplicação destes biocatalisadores, que ainda encontra-se em expansão, tanto em tamanho quanto em complexidade (Kirk et al., 2002).

Os benefícios oferecidos pelas enzimas comparados aos catalisadores químicos são a especificidade por substratos (controle dos produtos produzidos e minimização de reações laterais indesejadas), trabalhar em condições amenas (a planta industrial pode ser operada com menor capital e custos energéticos) e a menor produção de resíduos (menor custo no tratamento de resíduos e contribuição desprezível da enzima para a DBO) (Hasan et al., 2006).

O uso de enzimas como catalisadores em reações sintéticas em meio orgânicos não é muito recente; as primeiras utilizações datam do início do século XX. Entretanto, até o início dos anos 80 havia a concepção de que as enzimas apresentavam poucas utilidades em síntese orgânica, devido principalmente à idéia de que somente o meio aquoso era propício para manter a conformação estrutural de uma enzima cataliticamente ativa. Entretanto, após inúmeras pesquisas na área, sabe-se que muitas enzimas são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais com eficiência similar ou até superior àquela encontrada em soluções aquosas (Jesus et al., 1997; Zaks et al., 1988).

As enzimas hidrolíticas tais como lipases, celulasas e proteases são as mais comumente usadas na química orgânica. As razões para que estas tenham grande interesse atrativo à indústria deve-se a sua ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese, facilidade na utilização bem como a ampla especificidade para determinados substratos e a não necessidade de cofatores (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Entre alguns processos bioquímicos de grande interesse industrial estão as reações catalisadas por lipases, as quais representam aproximadamente 35% das

enzimas utilizadas em biotransformações na indústria (Oliveira et al., 2000; Paques et al., 2006).

2.1 Lipases

As lipases, juntamente com esterases e proteases, são consideradas catalisadores biológicos de grande versatilidade e eficiência destacando-se nos mais diversos meios reacionais devido à extensa gama de reações (hidrólise, esterificação, interesterificação, alcóolise, acidólise, aminólise e lactonização) (Figura 1), que podem ser catalisadas por estas enzimas em sistemas orgânicos (Yin et al., 2006; Kim et al., 2006; Paques et al., 2006; Jaeger et al., 1998).

Conhecidas como triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3), as lipases têm a capacidade de catalisar tanto reações de hidrólise de ácidos graxos, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (Villeneuve et al., 2000), quanto atuar na síntese de ésteres a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas. O deslocamento do equilíbrio na reação no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) é controlado pela quantidade de água presente na mistura do meio reacional. Estas reações se processam com alta regio e/ou enantio-seletividade, classificando as lipases como um grupo importante de catalisadores biológicos (Oliveira et al., 2000).

As lipases normalmente são encontradas em tecidos de animais (pâncreas, fígado e mucosa gástrica) e vegetais (sementes, polpas e raízes), podendo também ser produzidas por micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras). Além disso, as lipases apresentam um papel muito importante no metabolismo de lipídios destes seres vivos atuando como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reservas energéticas e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (Villeneuve et al., 2000).

Do ponto de vista econômico e industrial as lipases produzidas por micro-organismos apresentam vantagens em relação às obtidas a partir de fontes animais e vegetais, devido à sua relativa facilidade de produção e abundância de micro-organismos capazes de sintetizá-las. Além disso, lipases de animais e plantas apresentam alto custo de isolamento (Castro et al., 1995).

O enorme potencial biotecnológico atribuído às lipases está relacionado à: alta estabilidade em solventes orgânicos, ampla especificidade pelo substrato, não necessidade de co-fatores e elevada enantio-seletividade (Dumitriu et al., 2003).

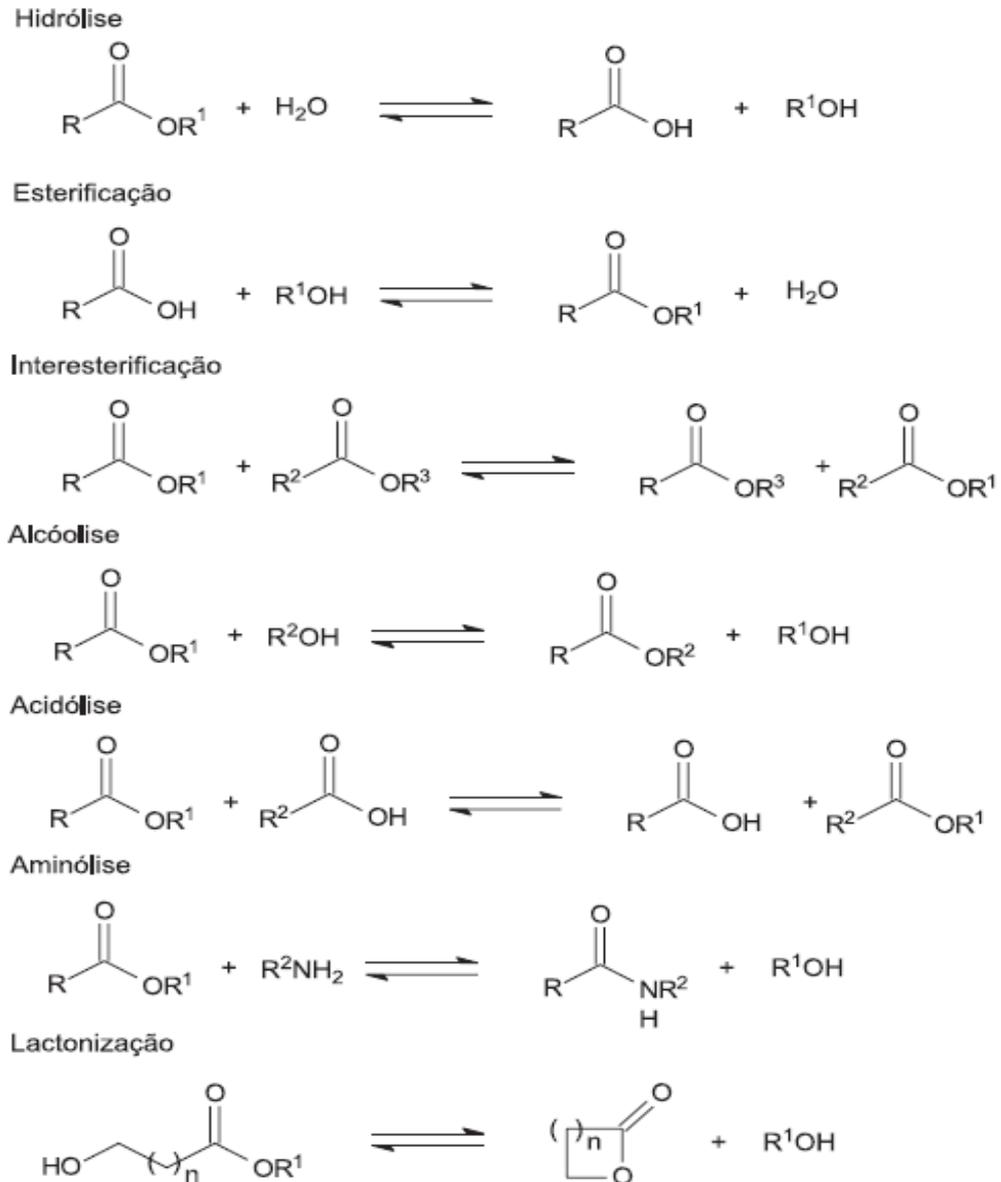


Figura 1 Reações catalisadas por lipases. Adaptado de Paques e Macedo (2006).

2.2 Lipase de pâncreas suíno

Segundo Garner e Smith (1972) a lipase pancreática (EC 3.1.1.3) pertence ao grupo das éster-hidrolases que atuam preferencialmente em triglicerídeos insolúveis em água nas emulsões em micelas e em filmes monomoleculares. Além disso, a

lipase proveniente de pâncreas suíno apresenta a característica de ser ativa somente nas interfaces.

A ação desta enzima em seu substrato proporciona um sistema em que são estudadas as interações lipídio-proteína tendo como base um modelo de ambiente celular mais complexo. Porém, é necessário o estudo de tais interações em que a lipase apresente uma composição química conhecida. A lipase de pâncreas suíno é caracterizada quimicamente como uma glicoproteína contendo 3,8 moles de manose e 2,9 moles de N-acetilglucosamina por mol de enzima.

2.3 Aplicações de lipases comerciais

As lipases são biocatalisadores que vêm se destacando cada vez mais no cenário da biotecnologia enzimática, devido à sua vasta versatilidade de aplicações, permitindo a catálise de reações de hidrólise, além de reações reversas como esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização (Paques e Macedo, 2006).

Estas reações de catálise enzimática com lipases, muitas vezes de características quimio, régio ou enatio-seletivas, são aplicadas em vários setores da indústria, razão pela qual a sua participação no mercado mundial de enzimas cresce de forma bastante significativa. Segundo descrevem alguns autores (Sharma et al., 2001; Hasan et al., 2006) estima-se que em um futuro próximo as lipases terão importância comparável à das peptidases que, atualmente representam de 25 a 40% das enzimas comerciais vendidas para aplicação industrial.

O crescente interesse no uso de lipases encontra-se principalmente em aplicações industriais de larga escala de enzimas, incluindo as mais diversas áreas, estando entre elas: formulações de detergentes, panificação, cervejaria, laticínios, síntese de medicamentos, produção de cosméticos e aromas, degradação de óleos e gorduras, indústria de papel e celulose (Liu et al., 2006; Ilanes, 2008).

Embora grande parte das aplicações de lipases ainda esteja voltada à indústria de detergentes e alimentos baseada principalmente em reações de hidrólise, novas aplicações nos campos da indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, produção de polpas e tratamento de resíduos industriais vêm se destacando, decorrentes do uso de lipases em reações de síntese e transesterificação (Castilho e Freire, 2000).

Na Tabela 1 estão apresentadas algumas aplicações industriais de lipases (Pasques e Macedo, 2006).

Tabela 1. Exemplos de aplicações industriais de lipase. Adaptado de Paques e Macedo (2006).

Área industrial	Aplicação	Produto
Alimentos	Hidrólise de gorduras de leite	Aromas para produtos matinais
	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas
Química	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos, monoglicerídeos
	Remoção de gorduras e manchas	Detergentes para lavanderias ou usos domésticos
Alimentos/química/farmacêutica	Síntese de ésteres	Ésteres e emulsificantes
	Transesterificação de óleos naturais	Óleos e gorduras
Cosméticos	Síntese de ésteres	Fragrância para perfumes
Médica	Determinação de triglicerídeos no sangue	Kits de diagnósticos

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator muito importante, pois a enzima dependendo a função que exercerá pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato (Castro et al., 2004).

Desta forma, os sistemas catalisados por lipases devem ser tratados caso a caso e as generalizações devem ser estudadas com cuidado. Assim, a seleção das condições adequadas na catálise enzimática em meios não convencionais deve

seguir uma cuidadosa manipulação do meio-ambiente do catalisador para que a produtividade do sistema obtenha a potencialidade total da atividade enzimática. Isso pode ser alcançado pela utilização de solventes apropriados, controle do teor de água no meio reacional e imobilização da enzima em suportes sólidos (Gomes et al., 2006).

2.4 Métodos de imobilização de enzimas

Sabe-se que as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos. Este processo pode ocorrer durante sua estocagem ou mesmo pelo seu uso. Para que a biocatálise possa ser eficiente em um determinado processo, ocorre necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação e que pode ocasionar sua inativação, impossibilitando a catálise da reação. Diante deste problema, técnicas de imobilização são utilizadas para fornecer estabilidade à enzima frente a faixas mais amplas de pH e temperatura, facilitar sua recuperação por menores interferências de inibidores ou ativadores, e reutilização da enzima por vários ciclos ao final do processo (Menoncin et al., 2009).

Segundo Brígida (2006), enzimas imobilizadas são aquelas que se encontram confinadas em um suporte que possa proteger a capacidade catalítica da enzima. O processo de imobilização consiste em circundar o material com atividade biológica em uma matriz polimérica envolvida por uma membrana semipermeável. Esta membrana permite a difusão de nutrientes e oxigênio, protegendo de perdas internas da célula, do stress mecânico e de compostos tóxicos (Qi et al., 2006).

A aplicação de enzimas nos processos industriais é uma realidade, entretanto, devido a sua natureza protéica são facilmente desnaturáveis e a produção em larga escala, com finalidade de aplicação industrial, torna seu custo elevado (Rodrigues, 1997).

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este

problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve et al., 2000).

No geral, os métodos mais utilizados para imobilização de enzimas são a adsorção e a oclusão da proteína no interior do polímero (Powell, 1990).

O processo de oclusão consiste no aprisionamento de uma enzima em uma matriz polimérica ou em uma membrana semipermeável, de tal forma que se permita a penetração do substrato e difusão dos produtos e impeça a liberação da proteína, conservando integralmente sua estrutura (Coughlan et al., 1988 apud Rodrigues, 1997).

No processo de adsorção, a fixação da proteína é puramente física, ou seja, a proteína adere à superfície de um suporte inerte, por meio de ligações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas e força de Van der Waals. A metodologia de adsorção de enzimas é um processo simples e de fácil execução, porém cabe ressaltar que sua maior desvantagem é que durante o processo de lavagem a enzima pode sofrer dessorção do suporte (Kemeny e Challacombe, 1988).

Outro benefício desta tecnologia é a possibilidade do desenvolvimento de processos contínuos, aumentando a produtividade e reduzindo os custos de produção (D'Souza, 2006 *apud* Brígida, 2006). Frente ao aumento da estabilidade promovido à enzima pela imobilização, outra aplicação que tem sido amplamente estudada é seu uso em reações promovidas em meios não convencionais, como solventes orgânicos, sistemas bifásicos, fluidos supercríticos e meios sólidos (Vermuë e Tramper, 1995; Gupta e Roy, 2004).

A utilização de enzimas imobilizadas em solventes orgânicos faz com que seja possível a eliminação de subprodutos em reações de hidrólise e ajuda no equilíbrio termodinâmico na reação de esterificação (Carta et al., 1992 *apud* Rodrigues, 1997).

As imobilizações por adsorção são usualmente realizadas pela incubação do suporte e da enzima em tampão ou pela precipitação da lipase com solventes, como acetona, sobre a superfície do suporte. Ao contrário do que ocorre com outras proteínas, a adsorção de lipases é favorecida em meios com baixa força iônica (Bastida et al., 1998). É preferível o emprego de suportes hidrofóbicos em relação aos suportes hidrofílicos para a imobilização de lipases devido à tendência dos suportes hidrofílicos competirem pela água disponível no meio reacional. Além disto,

a quantidade de enzimas adsorvidas em tais suportes é geralmente maior e são obtidas atividades enzimáticas mais elevadas. As resinas poliméricas como Accurel EP 100 (atualmente Accurel MP 1000), constituídas por polipropileno, e materiais contendo grupos hidrófobos de ligações como octil-agarose são exemplos de suportes que vêm se destacando como sendo apropriados à imobilização das lipases (Villeneuve et al., 2000).

Dentre os trabalhos encontrados na literatura pode-se citar o de Kaewthong et al. (2005). Os autores, imobilizando a lipase PS (Amano) em diferentes suportes, obtiveram rendimentos de 37,16% utilizando Accurel EP100 (<200 μ m), na imobilização em Accurel EP 100 (200-400 μ m) o rendimento encontrado foi de 31,10%, em carbonato de cálcio obtiveram rendimento de 0,79%, em Celite rendimento de 3,56%, em Sílica Gel o rendimento foi de 6,42% e em Carvão Ativado rendimento de 0,36%. Já Bryjak e Trochimczuk (2006), na imobilização de lipase de *Candida rugosa* por adsorção em suportes acrílicos, encontraram rendimento máximo de 25,4%. Em termos de retenção de atividade, Knezevic et al. (2002), imobilizando lipase de *Candida rugosa* em diferentes concentrações de alginato, obtiveram retenção máxima de 79,99%.

No processo de imobilização por adsorção, tanto a quantidade de enzimas adsorvidas quanto a orientação em que estas são imobilizadas afetam sua atividades e estabilidade (Nakanishi et al., 2002). Desta forma, além de avaliar a quantidade adsorvida, é necessário determinar os valores de atividade recuperada (atividade retida no suporte frente à diferença na atividade do sobrenadante antes e após a imobilização) e rendimento (diferença na atividade do sobrenadante antes e após a imobilização frente à atividade oferecida para a imobilização) obtidos para um dado processo de imobilização (Gitlesen et al., 1997).

A imobilização via inclusão ou microencapsulamento consiste em confinar a enzima em um polímero insolúvel (envolvido em fibra ou gel) ou em uma microcápsula (microencapsulamento). Desta forma, moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como subprodutos e produtos, difundem-se. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima interage quimicamente com o polímero, evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a velocidade de difusão dos substratos e

produtos através da membrana, bem como o peso molecular dos mesmos, são fatores limitantes (Dalla-Vecchia et al., 2004; Kennedy et al., 1988; Gonçalves, 2007; Brígida, 2006).

A encapsulação celular representa um método promissor para a imobilização de várias proteínas. A biocompatibilidade das micro-cápsulas é claramente importante, bem como os requerimentos para ótima biocompatibilidade, incluindo uma ótima micro-geometria da estrutura da membrana, um procedimento de encapsulação com uma ótima capacidade para envolver as células com grânulos perfeitos e o uso de materiais apropriados (Orive et al., 2002).

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados como suporte na imobilização de inúmeros tipos de recheio incluindo proteínas, enzimas, micro-organismos, aditivos alimentícios, pesticidas e compostos com atividade farmacológica. Alguns polímeros gelificam por geleificação iônica, geleificação térmica ou por uma combinação desses dois mecanismos. A preparação de microcápsulas através da geleificação iônica envolve a geleificação de uma solução polimérica aquosa com um íon de baixa massa molar, onde polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo. Mediante essa técnica, o material de recheio é extrusado como gota dentro de uma solução, formando uma gota gelificada (Rocha e Grosso, 2006).

Entre os hidrocolóides utilizados na forma de microcápsulas, encontram-se pectinas de baixo teor de esterificação, carragena e alginato de cálcio, todos requerendo um íon para a reticulação da matriz. A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade de ser termoestável, podendo ser armazenado à temperatura ambiente (Rocha e Grosso, 2006).

O alginato pode ser considerado como da família dos co-polímeros desde a fração e seqüência de dois monômeros, α -L-ácido-galurônico (G) e β -D-ácido manurônico (M), variar sobre uma larga taxa (Draget et al., 1997). O alginato tem sido o polímero mais utilizado para encapsulação celular (Orive et al., 2002). Com a adição de glutaraldeído a enzima se torna mais estável, ou seja, mantém seu potencial catalítico por mais tempo.

Dentre os fatores que contribuem para a queda de potencial catalítico durante os consecutivos ciclos destaca-se: desprendimento da enzima do suporte,

desativação da enzima pelo substrato; obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; perda do suporte por atrito ou dissolução; obstrução do leito fixo causando canais preferenciais e crescimento de micro-organismo (Brígida, 2006).

2.5 Imobilização de lipases

Para que a catálise enzimática possa competir com a produção química otimizada, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados. Um aspecto muito importante na utilização de enzimas em processos tecnológicos está relacionado ao custo de produção das mesmas.

Apesar das enzimas serem consideradas excelentes catalisadores, a sua aplicação em processos industriais pode ser limitada em razão de alguns outros fatores, tais como: solubilidade em água, baixa estabilidade quando comparada a catalisadores químicos, não pode ser utilizada em reações com solventes orgânicos, baixa resistência em temperaturas mais elevadas e, muitas vezes, por estar presente em baixas concentrações seu processo de purificação torna-se bastante trabalhoso, elevando seu custo e não sendo economicamente viável a sua separação do produto final (Melo et al., 2005).

O custo elevado da aplicação de biocatalisadores em processos industriais deve-se em parte à sua reduzida estabilidade frente às condições adversas a qual a enzima é submetida. Deste modo, a estabilização das enzimas é um processo desejável visto do ponto econômico. As enzimas quando utilizadas na forma solubilizada muitas vezes perdem parte de sua atividade catalítica, não podendo assim ser aproveitadas de maneira eficiente na reação catalítica. Por outro lado, além de constituir um desperdício financeiro, a presença de enzima residual da reação catalisada misturada com o produto final pode apresentar uma contaminação indesejável. Assim, o processo de imobilização de enzimas pode minimizar ou de certa forma até mesmo eliminar problemas encontrados quando da aplicação de enzimas livres (Dumitriu et al., 2003).

A imobilização de enzimas começou a ser estudada no início do século passado com o uso de carvão ativo, o qual havia sido adicionado a uma preparação

biológica com atividade de invertase, mantendo a capacidade de hidrolisar sacarose mesmo após a lavagem do catalisador. Após esta observação inicial da imobilização de enzimas em suportes insolúveis, o assunto só foi novamente retomado após a Segunda Guerra Mundial.

Em 1948, o bioquímico americano James Batcheller Sumner (1887-1955), ganhador do Prêmio Nobel de Química em 1946 pelo isolamento e cristalização da enzima urease e pela identificação da sua natureza protéica, reportou a imobilização deste biocatalisador (Bon et al., 2008).

A partir da década de 80 tem-se percebido um vasto interesse no desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas, visando assim minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, tais como: solventes orgânicos, variações de pH e sua estabilidade à altas temperaturas (Villeneuve et al., 2000; Sebrão et al., 2007).

De acordo com Melo et al. (2005) e Sebrão et al. (2007) enzimas imobilizadas são definidas como enzimas que estão fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região de espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio reacional, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio, com retenção de suas atividades catalíticas.

Nesta técnica, a enzima fica retida no interior dos poros ou na superfície de um material que é utilizado como suporte. O complexo enzima-suporte mantém as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel (Girelli e Mattei, 2005; Paiva et al., 2000).

Assim, a imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um período razoável de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Gomes et al. (2006) relatam que a imobilização tem efeito benéfico na estabilidade da enzima em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial para a condução de reações enzimáticas.

As vantagens das enzimas imobilizadas, em relação às solúveis, estão em sua maior estabilidade e facilidade de separação do meio de reação, o que acarreta

economia significativa no custo global do processo, desde que o procedimento de imobilização não seja dispendioso, haja boa recuperação da atividade enzimática e que a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa (Bon et al., 2008).

Durante o uso de enzimas imobilizadas, efeitos de transferência de massa podem ocasionar gradientes adversos de substratos ou de pH, que podem reduzir a velocidade de reação e o rendimento em produto. As propriedades dos derivados imobilizados são influenciadas tanto pelas propriedades da enzima como pelo material do suporte. A interação entre esses dois componentes proporciona um derivado imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas (Gomes et al., 2006; Tischer e Kasche, 1999).

Desta forma, a perda da atividade biocatalítica durante o processo de imobilização deve ser reduzida para compensar o custo extra da imobilização, o suporte poroso empregado deve ser apropriado para facilitar a transferência de reagentes e produtos e a purificação exaustiva da solução de substrato deve ocorrer para obter-se uma longa vida operacional do material imobilizado (Bon et al., 2008).

Na realização de um sistema de imobilização devem ser levados em conta alguns fatores, podendo-se destacar o tipo de interação entre o suporte e o biocatalisador, o qual pode influenciar diretamente na estabilidade e nos efeitos cinéticos da catálise (Villeneuve et al., 2000; Dalla-Vecchia et al., 2004).

O comportamento da enzima imobilizada e o desempenho do suporte empregado podem ser influenciados por vários parâmetros como pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, liberação de co-fatores e do substrato com a remoção dos produtos.

Entretanto, dos fatores citados, a maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é fornecida pela estratégia de imobilização empregada (Cárdias et al., 1999) e pelo suporte, de forma que a seleção do mesmo pode tanto aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada como afetar adversamente não só o tempo de meia-vida, mas o desempenho global do sistema (Gomes et al., 2006).

Segundo Oliveira et al. (2000) a imobilização de lipases ainda é um desafio complexo, uma vez que a eficiência da imobilização depende da estrutura da

enzima, do método de imobilização a ser empregado e do tipo de suporte. Em muitos casos, suportes que proporcionam uma elevada atividade e estabilidade da enzima, apresentam sérias limitações de resistência mecânica e de queda de fluxo do substrato, que os tornam inviáveis para a utilização em alguns tipos de reatores.

Alguns estudos mostram que uma vasta gama de materiais naturais, orgânicos, inorgânicos e sintéticos, apresentando diferentes características, densidade, forma e tamanho têm sido estudados para imobilização de lipases (Dalla Vecchia et al., 2004; Dumitriu et al., 2003; Villeneuve et al., 2000).

Em grande parte das imobilizações são empregados suportes inorgânicos porosos de alto custo devido as suas características de resistência mecânica ao ataque microbiano e grande área superficial disponível para a ligação com a enzima (Hernández- Jústiz et al., 1998; Gomes et al., 2006).

O uso de suportes porosos com grande superfície interna ativada, apresentando densas camadas de grupos altamente hidrofóbicos pode ser reconhecido pelas lipases em nível molecular como interfaces sólidas. Assim, é preferível o emprego de suportes hidrofóbicos em relação aos suportes hidrofílicos para imobilização de lipases, devido à tendência dos suportes hidrofílicos competirem pela água disponível no meio reacional (Villeneuve et al., 2000).

Estudos detalhados do sítio ativo das lipases têm relevado uma hidrofobicidade marcante das lipases comerciais, direcionando, desta forma, a seleção de suportes hidrofóbicos para garantir uma maior interação da lipase com a matriz selecionada. Além disto, a quantidade de enzima adsorvida em tais suportes é geralmente maior e são obtidas atividades enzimáticas mais elevadas (Oliveira et al., 2000).

A Tabela 2 apresenta uma compilação de dados apresentados na literatura, referentes ao emprego de diferentes lipases e suportes para imobilização de enzimas. Uma análise prévia desta tabela permite verificar que poucos trabalhos foram encontrados na literatura relacionados ao emprego de suportes inorgânicos de baixo custo para a imobilização de lipases. Alguns destes resultados serão descritos sucintamente a seguir, visando o embasamento teórico e também justificando a consecução do presente trabalho.

Os trabalhos de Yesiloglu (2004), Yesiloglu (2005), Rahman et al. (2005), Sanjay e Sugunan (2006), Gopinath e Sugunan (2007) e Meunier et al. (2010) utilizaram diferentes suportes argilosos para imobilização de lipases.

Rahman et al. (2005), por exemplo, imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* sobre caulim natural utilizando o método de adsorção e verificaram a viabilidade técnica de utilização deste suporte, obtendo um percentual de retenção da proteína sobre a superfície do suporte de 77%. Yesiloglu (2005) utilizou argila bentonita para imobilização de lipase de *Candida rugosa* por processo de adsorção. Os resultados mostraram atividade enzimática de 30% após a imobilização. Chang et al. (2007) avaliaram o processo de imobilização da lipase de *Candida rugosa* em Celite por adsorção obtendo rendimento de atividade após imobilização de 34,1%.

Trabalhos mais recentes também apontam a potencialidade de utilização de suportes inorgânicos para imobilização de lipases. Meunier et al. (2010) utilizaram diferentes tipos de Celite como suporte para imobilização de lipase comercial (Novozym 435) pela técnica de imobilização sol-gel. Os autores obtiveram rendimentos de imobilização de cerca de 60%. Secundo et al. (2008) imobilizaram a lipase de *Candida antarctica* por adsorção em argilas beidelite com diferentes relações Si/Al e verificaram rendimentos de imobilização de 24% em pH 6, chegando a 35% em pH 7. Zaidan et al. (2010) utilizaram mica modificada com tratamento ácido como suporte para imobilização da lipase de *Candida rugosa*, obtendo rendimento de imobilização superior a 78% e atividade específica de 83U/mg de proteína.

Outros autores utilizaram suportes inorgânicos para imobilização de outras classes de enzimas. Zamora et al. (2003) imobilizaram lacase obtida a partir de *Trametes versicolor* em montmorillonita KSF na sua forma natural e modificada com 3-aminopropiltriethoxysilano e glutaraldeído obtendo imobilização de 16 e 55% da enzima neste suporte. Gopinath e Sugunan (2007) e Sanjay e Sugunan (2006) imobilizaram as enzimas α -amilase, glucoamilase e invertase em argila montmorillonita K-10 utilizando técnicas de adsorção e ligação covalente. Os resultados apontaram rendimentos de imobilização bastante promissores, verificados através das isotermas de adsorção de nitrogênio (BET). Os autores visualizaram redução da área superficial do suporte de 201m²/g para 45, 15 e 10

m²/g, respectivamente, após o processo de imobilização, configurando a absorção da enzima pelo suporte. Spagna et al. (1995) imobilizaram a pectina-liase em bentonita, obtendo rendimento de imobilização de 16% e atividade de 67U/g.

Tabela 2. Lipases e suportes utilizados no processo de imobilização das enzimas.

Método de Imobilização	Suporte utilizado	Lipase utilizada	Referências
Adsorção	Resina Acrílica, Fibra de casca de coco, MCM-22 e MCM-36	<i>Candida antartica</i> , <i>Candida antartica</i> B	Du et al., 2004; Shimada et al., 1999; Wang et al, 2007; Watanabe et al., 2000; Pinheiro et al., 2001; Dumitriu et al., 2003
Adsorção	Membrana Têxtil	<i>Candida</i> sp. 99-125	Lu et al., 2007, 2008, 2010; Lv et al., 2008; Nie et al., 2006; Tan et al., 2006
Adsorção	Toyonita 200-M, polipropileno	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Iso et al., 2001; Salis et al., 2008; Soumanou e Bornscheuer, 2003
Adsorção	Terra Diatomácea	<i>Pseudomonas cepacia</i>	(alis et al., 2005; Shah e Gupta, 2007
Adsorção	Resina Aniônica, Celite-545	Pâncreas de porco, <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i>	Shah et al.,2004; Shieh et al., 2003; Yesiloglu, 2004
Adsorção	Metacrilato de glicidila Polivinil álcool (PVA), SBA-15 tipo fibra, SBA-15 tipo bastão, Accurel EP 100, Carvão ativo, Celite, Sílica gel	Pâncreas de porco, <i>Penicillium verrucosum</i> , Amano PS (Amano)	Kartal et al., 2009; Li et al., 2009a, 2009b; Menoncim et al., 2009; Villeneuve et al., 2000; Kaewthong et al., 2005
Adsorção	Suportes acrílicos, Alginato de sódio	<i>Candida rugosa</i>	Bryjak e Trochimczuk, 2006; Knezevic et al., 2002
Adsorção	MCM-41, Zeólitas (ITQ-2, ITQ 6, Na-Silicalite-1, H-Silicalite-1) e Zeólita X	<i>Rhizomucor miehei</i>	Macario et al., 2002; 2005; 2008; Frontera et al., 2005
Adsorção	Hidrotalícita, Zeólita 13-X, 5A, FM-8, AW-300	LipozymeTL-IM (Novozymes)	Yagiz et al., 2007
Adsorção	Zeolita Y	<i>Candida cylindracea</i> , <i>Fusarium solani pisi</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , Amano PS (Amano)	Knezevic ET al., 1998; Vidinha et al., 2006
Ligação Covalente	Silica-PVA, estireno-divinilbenzeno, poliacrilamida	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , Pâncreas de porco	Dizge et al., 2009a,b; Freitas et al., 2009; Bagi et al., 1997
Encapsulamento	Suporte sol-gel hidrofóbico Si-MCM-41, matrizes sol-gel	<i>Pseudomonas cepacia</i> NS44035 <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Fusarium solani pisi</i>	Meunier e Legge, 2010; Nouredini et al., 2005; Macario et al., 2008; Vidinha et al., 2006
Ligação cruzada	Glutaraldeído	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Kumari et al., 2007

A literatura não apresenta resultados referentes à atividade de esterificação de lipases imobilizadas em suportes inorgânicos, foco do presente trabalho. Com relação a este importante parâmetro, pode-se citar o trabalho de Dave et al. (2006), os quais imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em um polímero de álcool polivinílico (PVA), alginato e ácido bórico. Segundo os autores, a lipase imobilizada apresentou maior atividade de esterificação em relação à enzima na forma livre, atingindo grau de esterificação de 86% usando ácido hexanóico e etanol como substratos. O trabalho de Cabral et al. (2010) também avaliou a atividade de esterificação e estabilidade operacional da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em duas diferentes espumas de poliuretano (FHP2002 e FHP5000), obtendo índices de conversão de ésteres de 85,4 e 93,2%, respectivamente, com a lipase imobilizada utilizando etanol e ácido butírico como substratos. Maiores detalhes acerca dos trabalhos apresentados neste capítulo serão discutidos posteriormente, visando comparação destes resultados com os obtidos no presente trabalho.

2.5 Considerações finais

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo procurou-se relatar o estado da arte a respeito da imobilização de lipases em diferentes suportes bem como a relevância no desenvolvimento de um processo de imobilização eficaz do ponto de vista técnico e econômico, podendo vir a viabilizar a aplicação industrial deste biocatalisador.

Verificou-se que poucos trabalhos são relatados na literatura relacionados ao emprego de suportes inorgânicos de baixo custo, com vistas à viabilidade econômica do processo. Tal fato justificou o desenvolvimento desta pesquisa, concernente ao *screening* de suportes de baixo custo para imobilização de lipase extraída de pâncreas suíno. Após o *screening*, os suportes apontados como potenciais foram empregados na imobilização da lipase, visando a otimização do processo em termos de rendimento de imobilização, quantidade de enzima adsorvida e atividade de esterificação. Acredita-se que o desenvolvimento deste trabalho apresente relevância do ponto de vista do desenvolvimento de um processo

de imobilização de lipases, utilizando suportes de baixo custo, com potencialidade de aplicação do biocatalisador imobilizado em processos industriais.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e metodologia analítica empregada para o desenvolvimento do estudo relacionado à imobilização de lipase comercial derivada de pâncreas de porco em diferentes suportes inorgânicos, em termos de atividade enzimática, quantidade de enzima adsorvida e rendimento de imobilização. Os suportes selecionados como potenciais na etapa de *screening* foram utilizados na segunda etapa do trabalho, visando à otimização das condições de imobilização da enzima testada.

3.1 Enzima

A enzima empregada neste estudo foi uma lipase Tipo II em estado bruto obtida de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich), também conhecida como triacilglicerol acilhidrolase, com aspecto físico na forma de pó liofilizado, na cor amarelo claro, pH ótimo na faixa de 6,5 a 7,5 e com característica de hidrossolubilidade moderadamente solúvel.

3.2 Suportes

Os suportes empregados para a imobilização da lipase, sem nenhum tratamento prévio, utilizados no decorrer deste trabalho foram:

- Accurel MP-100 (Nortec);
- Accurel MP-1000 (Nortec);
- Accurel XP-100 (Nortec);
- Accurel XP-200 (Nortec);
- Alumina ativada Ácida (Merck – granulometria 0,063-0,200mm);
- Alumina ativada Básica (Merck – granulometria 0,063-0,200mm);
- Alumina ativada Neutra (Merck – granulometria 0,063-0,200mm);
- Caulim (Reagen);
- Caulim 1CR (Mineração Tabatinga – PR);
- MCM 22 (1:15 Si/Al – Detoni, 2005);
- MCM 22 (1:25 Si/Al – Detoni, 2005);

- MCM 22 (1:50 Si/Al – Detoni, 2005);
- Montmorilonita natural (Colorminas Colorifício e Mineração S/A);
- Montmorilonita natural Pilarizada (Laboratório de Química Ambiental-URI-Campus de Erechim);
- Montmorilonita K-10 (Sigma-Aldrich);
- Montmorilonita KSF (Sigma-Aldrich);
- Mordenita (www.iza-online.org);
- Resina Amberlyst 36 (wet) (Sigma-Aldrich);
- Resina Amberlite XAD-2 (Sigma-Aldrich);
- Zeólita Y (www.iza-online.org);
- Zeólita ZSM-22 (www.iza-online.org);
- Zeólita ITQ-2 (Laboratório de Química Ambiental-URI-Campus de Erechim);
- Zeólita NaX (www.iza-online.org);
- Zeólita ZSM-35 (www.iza-online.org);
- Zeólita ZSM-5 (www.iza-online.org).

3.3 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Agitador Orbital (Marconi MA-410);
- Agitador Magnético (Fisatom);
- Bomba a Vácuo (Marconi);
- Balança Analítica (Bel Engineering);
- Dessecador;
- Espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453);
- Difractômetro de Raios-X (Diffraktometer – modelo D 5000 – (Siemens));
- Analisador Textural por Adsorção de N₂ (Autosorb-1 Quantachrome (Nova-2200e));
- Espectrofotômetro FTIR (Shimadzu, modelo 8300);
- Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL – JSM 5800).

3.4 Imobilização da lipase comercial nos diferentes suportes

A lipase tipo II obtida de pâncreas de suíno foi imobilizada utilizando o princípio de adsorção. Neste sentido, os 25 suportes descritos anteriormente foram utilizados nesta etapa visando o *screening* do suporte mais adequado para posterior otimização do processo de imobilização.

Em 1g de cada um dos suportes, previamente pesados, adicionou-se 50mL de uma solução enzimática contendo 2g da lipase de pâncreas de suíno e 60mL de tampão fosfato de sódio 0,05mol/L. Esta solução foi mantida sob agitação magnética em temperatura de 5°C (banho de gelo) por 2 horas.

Após o término do processo de adsorção, as amostras foram filtradas a vácuo e permaneceram por 48 horas em dessecador. Em seguida, a atividade de esterificação da enzima imobilizada foi determinada, seguindo metodologia descrita a seguir. O conteúdo de proteína da solução de entrada e de saída foi avaliado pelo método de Bradford (1976). Para as leituras de absorbância no espectrofotômetro empregou-se comprimento de onda de 595nm.

3.5 Otimização do processo de imobilização

Após a etapa de *screening* utilizando 25 diferentes suportes, foram selecionados três suportes derivados do grupo das argilas devido aos melhores resultados apresentados no primeiro estudo de imobilização visando à otimização do processo de imobilização.

Os suportes empregados na otimização do processo de imobilização foram: argila montmorillonita KSF, argila montmorillonita natural e argila montmorillonita natural pilarizada.

Para esta etapa de otimização foram avaliados diferentes tempos de contato enzima/suporte (60, 120 e 180 minutos) para os três suportes selecionados anteriormente. Outra variável estudada no processo de otimização foi a razão mássica enzima/suporte, empregando três diferentes razões (2:1; 2:0,5 e 2:2) para as três argilas.

O procedimento de imobilização da lipase tipo II obtida de pâncreas suíno foi semelhante ao descrito anteriormente, variando apenas o tempo de imobilização e a relação enzima/suporte.

Nesta etapa, durante o processo de imobilização foram retiradas alíquotas de 500 μ L apenas dos tempos iniciais, finais, entrada e saída de cada procedimento de adsorção para posteriores medidas do teor de proteína e construção dos gráficos do rendimento de imobilização (%) em função do tempo para cada um dos três suportes e relações da quantidade enzima/suporte estudados.

Nas amostras coletadas nos tempos iniciais e finais, nas soluções de entrada e de saída foram retiradas alíquotas de 100 μ L e realizada diluição de 6x (100 μ L de amostra/500 μ L de H₂O destilada). Desta diluição retirou-se 100 μ L de amostra em tubos de ensaio (triplicata) e adicionou-se 5mL do Reagente de Bradford para realização da leitura de absorbância.

O cálculo do rendimento de imobilização e teor de proteína foi realizado conforme descrito a seguir.

3.6 Métodos empregados durante o processo de imobilização

Determinação do teor de proteínas

Para a determinação de proteínas pelo método de Bradford foi utilizado Reagente de Bradford e uma curva padrão de albumina (1mg/mL) em tampão fosfato de sódio 0,1mol/L pH 6,5.

Para a medida de proteína foi utilizada diluição de 6X (100 μ L da amostra líquida retirada nos diferentes tempos como descritos anteriormente/500 μ L de H₂O destilada). Desta diluição retirou-se 100 μ L de amostra em tubos de ensaio (triplicata) e adicionou-se 5mL do Reagente de Bradford para realização da leitura de absorbância.

As amostras foram lidas em espectrofotômetro (Agilent Technologies 8453) com comprimento de onda 595nm, sendo que a concentração de proteína de cada amostra foi calculada conforme Equação 3.1:

$$[]_{prt} = \frac{Abs.}{fator} \cdot 10 \cdot d \quad (3.1)$$

onde:

[]_{prt}= Concentração de proteína (mg prot./mL);

Abs= Absorbância lida nas amostras a 595nm;

d= Diluição das amostras;

fator = valor obtido na curva de calibração.

Determinação da atividade de esterificação

Para medida da atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada nos diferentes suportes em estudo foi empregada a metodologia descrita por Rigo (2009), utilizando-se ácido oléico (Sigma-Aldrich) e etanol 99% (Merck) como precursores para a reação de esterificação.

Para determinação da atividade de esterificação pesou-se uma massa de 0,4g de enzima imobilizada e, em seguida, foram adicionados os precursores reacionais (ácido oléico/etanol) na proporção molar de 1:1. Após a mistura foi incubada por 40 minutos a 40°C sob agitação de 150rpm.

Após o período de incubação, foram retiradas alíquotas (triplicata) de 300µL da mistura (ácido oléico/etanol/enzima imobilizada) e a reação foi interrompida pela adição de 20mL de uma solução de acetona/etanol 1:1 (v/v).

Após as soluções foram titulados até pH 11,0 com uma solução de NaOH 0,02mol/L. Os brancos para cada reação foram preparados retirando-se alíquotas (triplicata) de 300µL anteriormente à incubação e interrompendo-se a reação com 20mL da solução de acetona/etanol 1:1 (v/v).

Os brancos foram também titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,02mol/L. As medidas de atividade foram realizadas em triplicata para cada amostra imobilizada nos diferentes suportes estudados. As atividades de esterificação foram determinadas por meio da Equação 3.2.

$$\text{Atividade lipásica (U/ml)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot N \cdot 1000 \cdot V_t}{t \cdot V_{al} \cdot V_{am}} \quad (3.2)$$

Onde:

Va = volume de NaOH gasto na titulação da amostra;

Vb = volume de NaOH gasto na titulação do branco;

N = Normalidade da solução de NaOH padronizada;

Vt = Volume reacional total (5mL);

t = tempo de reação (40min);

Val = volume de alíquota (0,3mL);

Vam = volume de extrato enzimático equivalente à massa de enzima imobilizada usada.

Determinação do rendimento de imobilização

Durante o processo de imobilização nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos e das soluções de entrada e saída foram retiradas alíquotas de 500µL para posterior medida do teor de proteína e cálculo do rendimento da imobilização, de acordo com a Equação 3.3.

$$\eta (\%) = \frac{P_s}{P_o} \times 100 \quad (3.3)$$

onde:

η = Rendimento (%);

P_s = Quantidade de proteína absorvida (diferença entre a inicial e a estável);

P_o = Quantidade de proteína utilizada na imobilização (solução de entrada).

3.7 Caracterização dos suportes e enzimas imobilizadas

Os suportes empregados apresentam diferentes características específicas, principalmente quanto à área superficial, tamanho de poros e composição estrutural. Desta forma foram empregadas diferentes técnicas de caracterização para analisar estas diferenças, nos suportes pré-selecionados na etapa de *screening*.

As técnicas utilizadas para a caracterização dos suportes e das enzimas imobilizadas nos diferentes suportes estudados na etapa de otimização do processo de imobilização foram: Difração de Raios-X, Microscopia Eletrônica de Varredura,

Análise Textural por Adsorção de N₂ e Espectroscopia de Infravermelho, conforme metodologia descrita a seguir.

Difração de Raios-X

As análises de difração de raios X foram realizadas no Laboratório de Difração de Raios-X da UFRN, num Diffraktometer modelo D5000 (Siemens) utilizando filtro de Ni e radiação Cu- $\kappa\alpha$ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$).

Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da UFRN, num microscópio JEOL - JSM 5800 com voltagem de aceleração de 20KV e magnificações de 200x, 1.000x e 10.000x.

Análise Textural por Adsorção de N₂

A caracterização textural dos suportes foi realizada utilizando num Autosorb-1 da Quantachrome (Nova-2200e). Antes da análise, cerca de 100mg das amostras (suportes) foram tratadas a vácuo, a uma temperatura de 300°C por 3h. Para as amostras imobilizadas e a lipase livre empregou-se tratamento a vácuo à temperatura de 33°C por 3h. As medidas foram realizadas na temperatura do N₂ líquido.

Espectroscopia de Infravermelho

A análise de espectroscopia no infravermelho de refletância difusa com transformada de Fourier (DRIFTS) foi realizada no Laboratório de Análise Instrumental da UFRGS, em um espectrofotômetro FTIR Shimadzu, modelo 8300.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, relacionados ao *screening* de suportes para imobilização da lipase de pâncreas de porco e à etapa de otimização do processo de imobilização utilizando três suportes selecionados na etapa de *screening*. Primeiramente, foi realizada uma caracterização parcial de todos os suportes testados, visando possibilitar a discussão dos resultados obtidos no *screening*. Os suportes utilizados na etapa de otimização do processo de imobilização bem como as enzimas imobilizadas nestes suportes foram caracterizados de forma mais detalhada.

Anteriormente ao processo de imobilização foi realizada a caracterização dos materiais empregados como suporte. Para um primeiro estudo de caracterização parcial, os suportes foram subdivididos em três classes: Argilas, Zeólitas, Óxidos e outros materiais.

Alguns autores (Dumitriu et al., 2003; Macario et al., 2002 e 2008; Li et al., 2009; Fuentes et al., 2001; Gopinath e Sugunan, 2007 e Meunier et al., 2010) reportam em seus trabalhos várias técnicas para caracterização de suportes sólidos tais como: Difração de Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ressonância Magnética Nuclear de Massa (RMN-MAS), Espectroscopia de Infravermelho (IV-FT) e isotermas de Adsorção de Nitrogênio (BET).

Estas análises de caracterização dos suportes têm como finalidade principal estimar a cristalinidade, tipo de estrutura, morfologia, tamanhos dos cristais, diâmetro de poro e área superficial específica de cada material a ser empregado como suporte na imobilização de enzimas (Secundo et al., 2008; Dumitriu et al., 2003; Zaidan et al., 2009; Macario et al., 2005; Li et al., 2009; Huang et al., 2009 e Sanjay e Sugunan, 2006). Levando em consideração estas citações, as análises empregadas para caracterização dos suportes utilizados na etapa de *screening* foram Difração de Raios-X e Análise Textural por Adsorção de N₂.

4.1 Argilas

4.1.1 Caracterização parcial das argilas utilizadas na etapa de *screening*

As argilas empregadas para o *screening* de suportes foram: Montmorillonita K10, Montmorillonita KSF, Caulim comercial (Reagen), Caulim Mina 1CR, Montmorillonita Pilarizada Poço A e Montmorillonita Poço A.

Montmorillonitas comerciais KSF e K-10

A Figura 2 apresenta os difratogramas de raios X das argilas comerciais montmorillonita KSF e K10. As argilas comerciais KSF e K-10 são obtidas por diferentes tratamentos. A argila KSF é obtida por um tratamento com ácido sulfúrico à temperatura ambiente, que normalmente resulta numa simples troca iônica dos cátions Na, Ca e Mg por prótons. Este processo resulta em uma pequena extração de Al, Mg e Fe da estrutura da montmorillonita (Cseri et al., 1995). A argila K-10 é obtida por um processo similar ao da KSF, empregando altas temperaturas, o que ocasiona, além dos efeitos mencionados anteriormente, uma destruição parcial da estrutura da argila (Cseri et al., 1995).

O difratograma de raios X da argila K10 (Figura 2) apresenta uma larga reflexão a $2\theta = 6^\circ$ ($d=14,7\text{Å}$), indicando a presença um argilo-mineral do grupo da esmectita. Pode-se observar também reflexões a $2\theta = 9^\circ$ ($d=10,0\text{ Å}$) e $2\theta = 18^\circ$ ($d=4,9\text{ Å}$), sugerindo a presença de mica. A argila KSF apresentou também uma reflexão a $2\theta = 6^\circ$ ($d=14,7\text{Å}$), equivalente ao grupo da esmectita. Ambas as argilas apresentaram uma forte reflexão em $2\theta = 27,4^\circ$ ($d= 3,25\text{Å}$), indicando a presença de quartzo.

Os difratogramas dos materiais KSF e K10 possuem as reflexões referentes ao grupo da esmectita (montmorillonita) menos evidenciados do que os obtidos em difratogramas de argilas naturais, isso é um indício de que o tratamento ácido para a obtenção destes materiais provoca uma destruição parcial da estrutura.

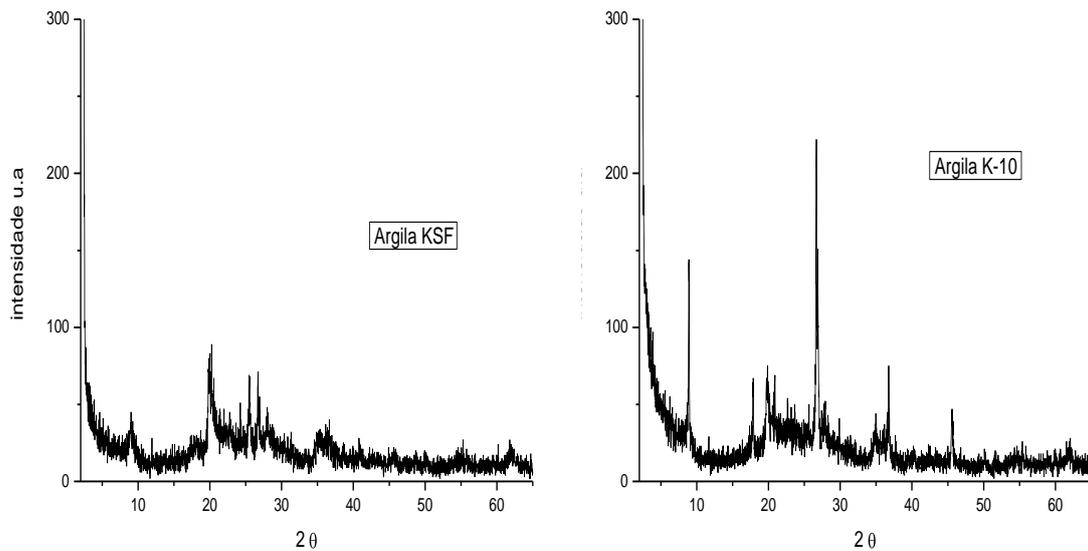


Figura 2. Difratoograma de raios-X das argilas comerciais KSF e K-10.

A Tabela 3 apresenta as áreas superficiais das montmorillonitas KSF e K-10. A partir dos dados apresentados percebe-se que a argila comercial K-10 possui uma área superficial muito superior a da argila KSF. Isto é mais um indicativo de que o tratamento ácido sofrido pela K-10 é mais rigoroso, ocasionando destruição da estrutura e desorganização da mesma, provocando, desta forma, um aumento da área superficial.

Tabela 3. Área superficial específica das argilas comerciais KSF e K-10.

Amostras	Área (m ² /g)
K-10	224,5
KSF	12,4

Caulim comercial e Caulim Mina 1CR

A Figura 3 apresenta os difratogramas de raios X do caulim comercial e caulim mina 1CR. Observa-se que o caulim Mina é constituído essencialmente por caulinita, apresentando, entretanto, algumas impurezas como mica, gibsita e quartzo. Por outro lado, o caulim comercial (Reagen) apresentou mínima

quantidade de caulinita, tendo como fases majoritárias talco, mullita, cristobalita e quartzo.

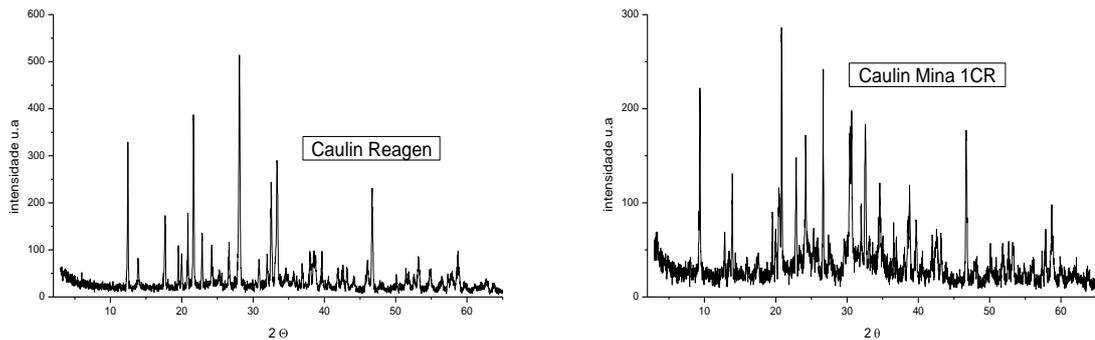


Figura 3 Difratoograma de raios-X do caulim (Reagen) e caulim mina 1CR.

A Tabela 4 apresenta as áreas superficiais dos materiais, calculadas através do método BET, utilizando os dados de adsorção de nitrogênio. Com base nestes dados, pode-se observar que o caulim mina possui uma área de 61 m²/g, de acordo com a área de materiais lamelares. Entretanto, o caulim comercial apresenta uma área relativamente baixa, comprovando mais uma vez que as fases estão presentes em maior quantidade que a caulinita.

Tabela 4. Área superficial específica dos caulims Mina 1CR e Reagen.

Amostras	Área (m ² /g)
Mina 1CR	61,3
Reagen	4,1

Montmorillonitas Poço A e Poço A pilarizada.

A Figura 4 apresenta os difratogramas de raios X das argilas montmorillonita Poço A e Poço A Pilarizada. Pela análise dos difratogramas de raios X observa-se que ambas as argilas possuem quartzo como impureza ($2\theta = 27^\circ$) e um pico em $2\theta = 20^\circ$, característico de argilas montmorillonitas. A posição do pico 001 destes materiais é um indicativo do espaçamento basal das lâminas e, conseqüentemente, uma comprovação do processo de pilarização. Efetivamente, a argila poço A possui um espaçamento basal (calculado pela lei de Bragg) de $9,7\text{\AA}$ quando calcinada e de $15,12\text{\AA}$ na forma hidratada. Após o processo de pilarização este espaçamento aumenta para $18,62\text{\AA}$, comprovando, desta forma, que o processo de pilarização ocorreu.

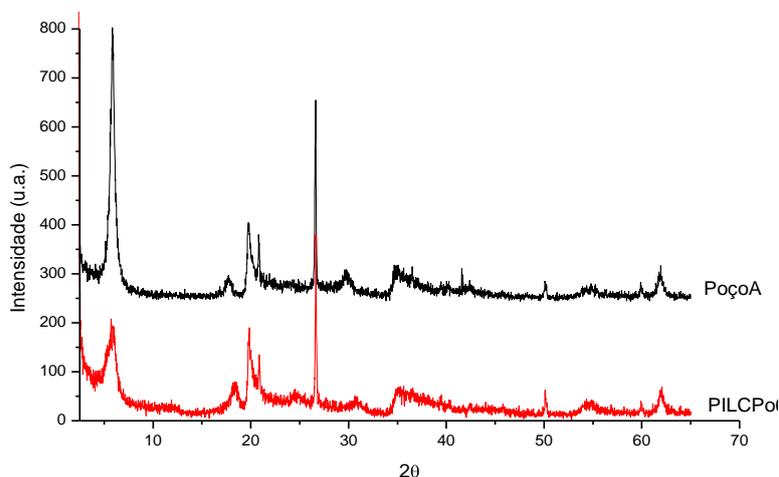


Figura 4. Difratograma de raios-X argilas Poço A e Poço A Pilarizada.(PILC)

A Tabela 5 apresenta as áreas superficiais das argilas montmorillonitas Poço A e Poço A Pilarizada. As áreas foram determinadas através dos dados de adsorção de nitrogênio aplicando o método BET. A partir dos resultados percebe-se que a eficiência no processo de pilarização é considerada satisfatória uma vez que a área superficial da argila pilarizada aumenta significativamente em relação ao da argila natural, sendo este aumento de aproximadamente 3 vezes.

Tabela 5. Área superficial específica das argilas Poço A e Poço A Pilarizada.

Amostras	Área (m ² /g)
Poço A	62,7
Poço A Pilarizada	196,9

4.1.2 Rendimento de imobilização da lipase nas argilas

Para determinação da quantidade de proteína adsorvida durante o processo de *screening* em cada suporte empregou-se o método de Bradford (1976), através de análises por espectrofotometria. Inicialmente realizou-se o estudo cinético de adsorção analisando as alíquotas retiradas durante o processo de imobilização nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, além das soluções de entrada e saída. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

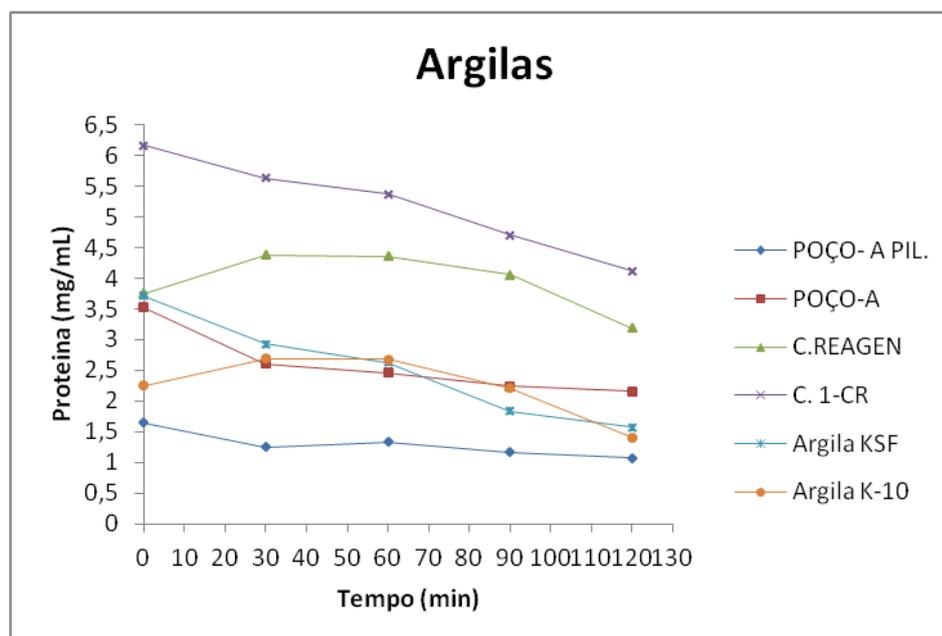


Figura 5 Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em argilas.

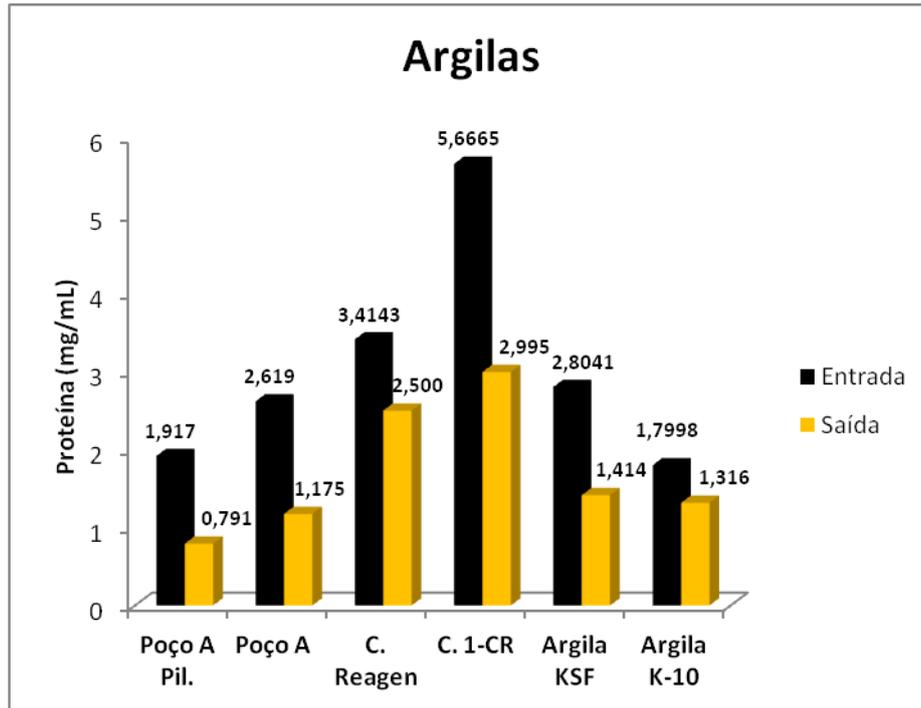


Figura 6. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em argilas, antes e após o processo de imobilização.

Ao analisar estes resultados, nota-se que todos os suportes argilosos empregados mostraram-se eficientes ao processo de adsorção da enzima, ocorrendo diminuição da quantidade de proteína presente na solução após 120 minutos de imobilização. Estes resultados estão de acordo com alguns trabalhos apresentados na literatura referentes à imobilização de lipases em diferentes argilas (Yesiloglu, 2004 e 2005; Rahman et al., 2005; Sanjay e Sugunan, 2006; Gopinath e Sugunan, 2007; Meunier et al., 2010).

Os resultados obtidos referentes à quantidade de proteína adsorvida, o rendimento da imobilização e quantidade de lipase imobilizada no estudo de imobilização da lipase comercial Tipo II em estado bruto obtida de pâncreas suíno (EC 232-619-9) nas argilas empregadas no *screening* estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas.

Amostra	Proteína Adsorvida (mg/mL)	Rendimento de imobilização (%)	Lipase imobilizada (g)
Argila KSF	2,1402	76,32	1,5340
Poça A	1,3622	52,01	1,0481
Argila K-10	0,8393	46,63	0,9367
Caulim 1-CR	2,0470	36,12	0,7270
Poço A Pil.	0,5747	29,98	0,6053
Caulim Reagen	0,5624	16,47	0,3320

Em relação à Tabela 6 percebe-se que o processo de imobilização foi mais eficiente para as argilas KSF, Poço A e K-10, com rendimentos de imobilização superiores e próximos a 50% em relação à quantidade de enzima utilizada no início do processo. Isto provavelmente se deve à maior afinidade da enzima por estes suportes. Segundo Li et al. (2009) e Zhou et al. (2009), os grupos hidroxilas livres presentes na superfície destes suportes podem formar ligações pontes de hidrogênio com os grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima, promovendo maior eficiência no processo de imobilização. Além destas forças, uma fraca interação de forças de Van der Waals também pode auxiliar na adsorção da enzima na superfície do suporte. As interações hidrofóbicas das moléculas enzima-suporte podem contribuir na adsorção por interações de partes hidrofóbicas da lipase com a rede sílica do suporte (Yadav e Jadhav, 2005).

Os caulins possuem uma estrutura 1:1 neutra enquanto que as montmorilonitas possuem uma estrutura 2:1 e alta CTC (capacidade de troca catiônica), conduzindo ao favorecimento da imobilização nas argilas montmorillonita s.

Rahman et al. (2005) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* sobre caulim natural, aplicando o método de adsorção. A determinação da quantidade de proteína imobilizada foi realizada pelo método de Bradford (1976). Os autores obtiveram resultados da ordem de 77% de retenção da proteína sobre a superfície do suporte.

Outros autores utilizaram diferentes argilas para imobilização de lipases. Como exemplo, Zamora et al. (2003) imobilizaram lacase a partir de *Trametes versicolor* em montmorillonita KSF na sua forma natural e modificada com 3-amino-propil-trietoxisilano e glutaraldeído. Os autores obtiveram rendimentos de imobilização de 16 e 55% da enzima nestes suportes, respectivamente.

Gopinath e Sugunan (2007) e Sanjay e Sugunan (2006) imobilizaram as enzimas α -amilase, glucoamilase e invertase em argila montmorillonita K-10 utilizando técnicas de adsorção e ligação covalente. Rendimentos de imobilização significativos foram obtidos através da análise por isotermas de adsorção de nitrogênio (BET), através da observação de redução da área superficial de 201 m²/g para 45, 15 e 10 m²/g após imobilização de cada enzima, respectivamente.

Yesiloglu (2005) utilizou argila bentonita para imobilização de lipase de *Candida rugosa* por processo de adsorção, apresentando atividade enzimática de 30% após imobilização. Spagna et al. (1995) imobilizaram uma pectiniliase comercial em bentonita obtendo um rendimento de imobilização de 16% e atividade enzimática de 67U/g.

Chang et al. (2007) imobilizaram lipase de *Candida rugosa* em Celite por adsorção obtendo rendimento de atividade após imobilização de 34,1%. Zaidan et al. (2010) utilizaram mica modificada com tratamento ácido como suporte para imobilização da lipase de *Candida rugosa*, obtendo rendimento de imobilização superior a 78% e atividade específica de 83U/mg de proteína. Meunier et al. (2010) utilizaram diferentes tipos de Celite como suporte para imobilização de lipase comercial (Novozym 435) pela técnica de imobilização sol-gel e obtiveram índices de imobilização de 60%. Secundo et al. (2008) imobilizaram a lipase de *Candida antarctica* por adsorção em argilas beidelite com diferentes relações Si/Al. Os resultados de imobilização obtidos foram de 24% em pH 6 chegando a 35% em pH 7.

No caso da argila Poço A pilarizada, a região interlamelar possui pilares que mantém a estrutura pilarizada, este processo de pilarização diminui a CTC da argila, o que poderia estar provocando uma diminuição do rendimento de imobilização, apesar do material pilarizado ser mais acessível.

4.1.3 Atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada em argilas

A atividade de esterificação da enzima livre e imobilizada nas argilas foi determinada utilizando ácido oléico e etanol como substratos, conforme metodologia descrita anteriormente. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Atividade de esterificação da lipase comercial de pâncreas suíno na forma livre e imobilizada em argilas.

Amostra	Atividade de esterificação (U/g)
Enzima livre	739,69
Lipase imobilizada (Argila Poço A Pil.)	154,61
Lipase imobilizada (Argila K 10)	152,24
Lipase imobilizada (Argila Poço A)	129,13
Lipase imobilizada (Caulim Reagen)	28,89
Lipase imobilizada (Caulim 1 CR)	26,11
Lipase imobilizada (Argila KSF)	15,96

A literatura não apresenta muitos resultados referentes à atividade de esterificação de lipases imobilizadas em argilas. Entretanto, Dave et al. (2006) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em um polímero de álcool polivinílico (PVA), alginato e ácido bórico. Segundo os autores, a lipase imobilizada apresentou atividade de esterificação de 86% em comparação à enzima na forma livre, em sistema utilizando ácido hexanóico e etanol como substratos.

Cabral et al. (2010) avaliaram a atividade de esterificação e estabilidade operacional da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano, obtendo 85,4 e 93,2% para cada parâmetro, respectivamente, com a lipase imobilizada, aplicando etanol e ácido butírico como substratos. Oliveira et al. (2001) também realizaram o estudo cinético de esterificação em ácido oléico e etanol empregando lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada por adsorção em Accurel EP700, obtendo um índice de conversão de 80,17%. Segundo os autores, o uso de enzimas imobilizadas pode levar a efeitos difusionais na atividade por causa da presença adicional da fase sólida no meio. Este problema

pode ocorrer quando há baixas concentrações de ácido oléico e etanol no sistema reacional.

Zaidan et al. (2010) determinaram a atividade de esterificação utilizando lipase de *Candida rugosa* imobilizada em mica modificada com tratamento ácido, obtendo rendimentos de imobilização de 40,6% e atividade de esterificação de 292,2U/g de suporte. Rahman et al. (2005) avaliaram a atividade de esterificação da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em caulim natural por adsorção física, obtendo um resultado de 77% de enzima imobilizada sobre o suporte e atividade de esterificação de 90% em comparação à enzima livre, utilizando ácido oléico e 1-butanol como substratos à temperatura de 50°C.

Em relação aos dados apresentados na Tabela 7 pode-se verificar uma maior atividade catalítica de esterificação para enzimas imobilizadas nas argilas poço A pilarizada e K-10. Este resultado pode estar provavelmente relacionados às maiores áreas superficiais destes suportes, conduzindo à maior acessibilidade dos substratos ao sítio ativo da enzima, levando a maiores atividades enzimáticas. Segundo Yesim e Yesiloglu (2005) algumas argilas, como as bentonitas, têm um enorme potencial para serem utilizadas como adsorventes, devido ao seu baixo custo, uma vez que a mesma está disponível naturalmente e possui uma elevada área superficial

4.2 Zeólitas

4.2.1 Caracterização parcial das zeólitas utilizadas na etapa de *screening*

Os materiais zeolíticos empregados na etapa de *screening* de suportes para imobilização da lipase de pâncreas de porco foram: Zeólita Y, Zeólita ZSM-22, Zeólita ITQ-2, Zeólita NaX, Zeólita ZSM-35, Zeólita ZSM-5 e Mordenita. A Figura 7 apresenta os difratogramas de raios X das zeólitas citadas anteriormente.

As zeólitas são sólidos porosos cujo diâmetro de poros possui pequenas variações e têm em sua composição átomos de silício e alumínio, ligados por átomos de oxigênio, arranjados em uma estrutura cristalina. Em geral, as

zeólitas apresentam poros com abertura de 2 a 20Å, e por esta razão são denominados materiais microporosos (Martinez, 2002; Giannetto et al., 2000).

Pela análise dos difratogramas obtidos neste trabalho com os da literatura (Mignoni et al., 2006, 2007; Pergher et al., 2003, 2005; Detoni et al., 2006; Masih et al., 2007; Fan et al., 2006), comprova-se as estruturas dos materiais zeolíticos observando-se diferentes morfologias para os cristais, indicando a variedade de estruturas.

A Tabela 8 apresenta as áreas superficiais das zeólitas Y, ZSM-22, ZSM-35, ZSM-5, NaX, ITQ-2 e Mordenita. As áreas foram determinadas através do método BET usando os dados de adsorção de nitrogênio.

4. Resultados e Discussão

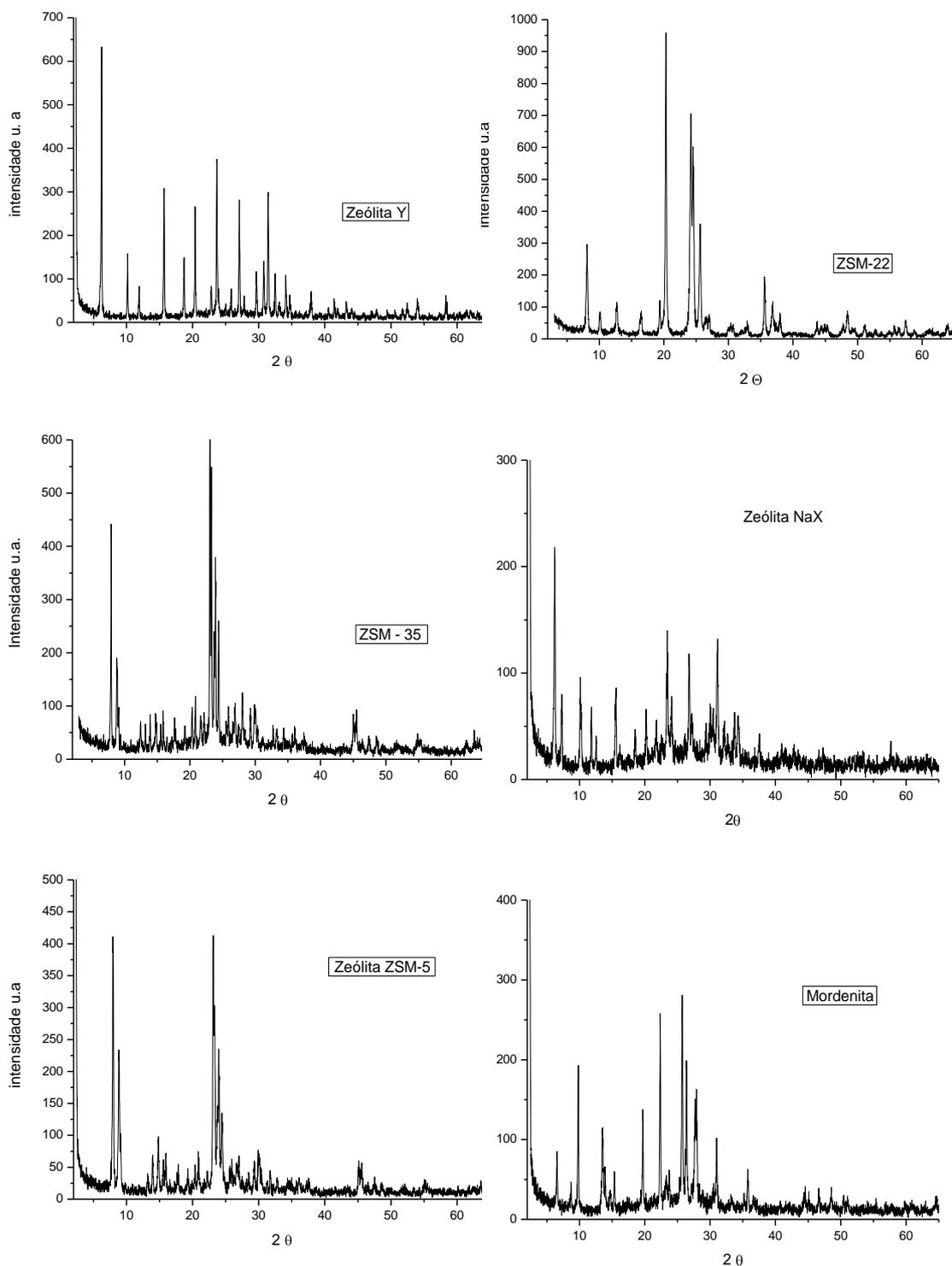


Figura 7. Difratoograma de raios-X das zeólitas Y, ZSM-22, ZSM-35, NaX, ZSM-5 e Mordenita.

Tabela 8. Área superficial específica, diâmetro de poros e tipo de estrutura das zeólitas Y, ZSM-22, ZSM-35, ZSM-5, NaX, ITQ-2 e Mordenita.

Amostras	Área (m ² /g)	Diâmetro de poro Å
Zeólita Y	568	7,4 x 7,4
Zeólita ZSM 22	39	4,6 x 5,7
Zeólita ZSM 35	277	5,4 x 4,2 / 4,8 x 3,5
Zeólita ZSM 5	364	5,1 x 5,5 / 5,3 x 5,6
Zeólita NaX	432	7,4 x 7,4
Zeólita ITQ-2	107	4,0 x 5,5 + mesop
Mordenita	146	7,0 x 6,5 / 5,2 x 2,6

4.2.2 Rendimento de imobilização da lipase nas zeólitas

As Figuras 8 e 9 apresentam os resultados da cinética de adsorção da lipase nas diferentes zeólitas empregadas. Através dos resultados pode-se observar que o comportamento cinético de adsorção da lipase apresenta oscilação em função dos suportes zeolíticos empregados, ocorrendo que a imobilização varia de forma similar com o tempo para cada zeólita, podendo-se verificar que a enzima foi imobilizada de forma eficiente em todos os materiais testados.

Os resultados obtidos em relação à quantidade de proteína adsorvida, o rendimento da imobilização e quantidade de lipase imobilizada no processo de imobilização nas zeólitas empregadas neste estudo estão apresentados na Tabela 9.

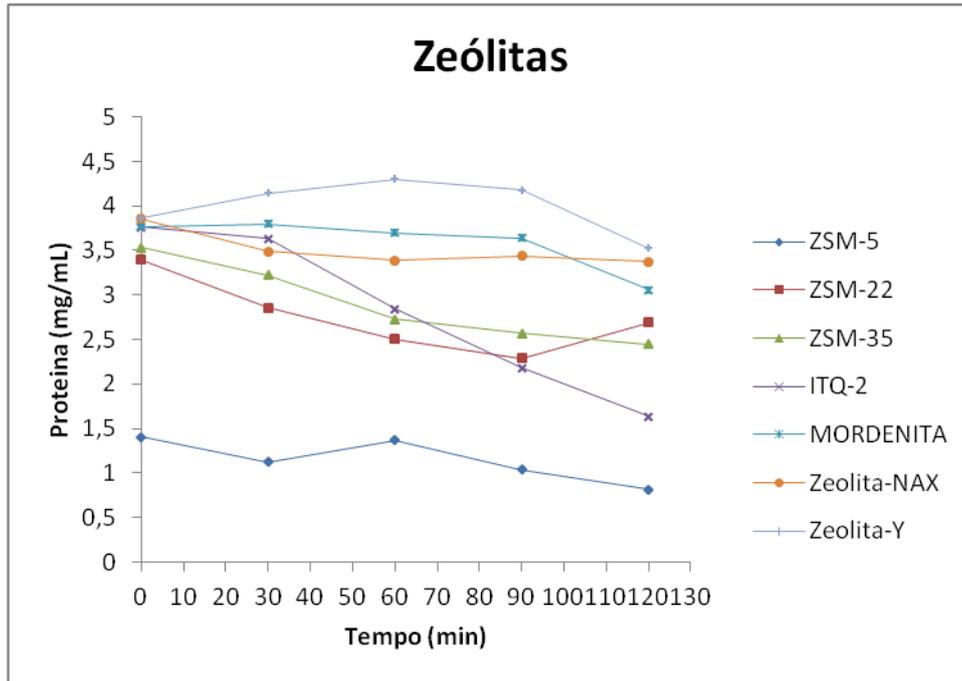


Figura 8. Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em zeólitas.

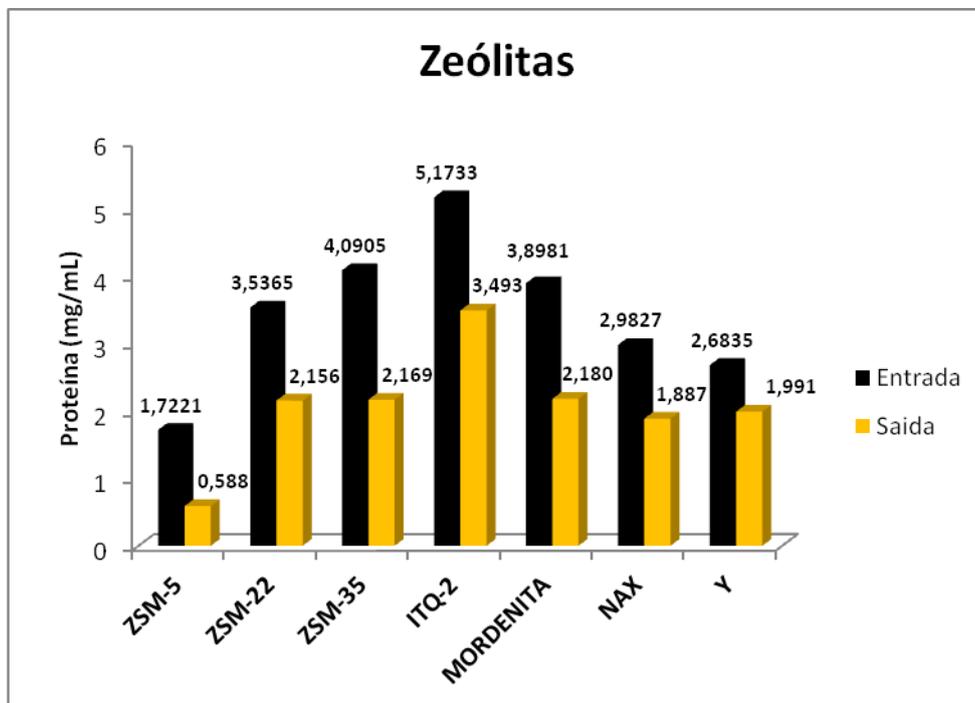


Figura 9. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em zeólitas, antes e após o processo de imobilização.

Tabela 9. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas zeólitas.

Amostra	Proteína Adsorvida (mg/mL)	Rendimento de imobilização (%)	Lipase imobilizada (g)
Zeólita Y	0,3343	12,46	0,2504
Zeólita NaX	0,4879	16,35	0,3281
Mordenita	0,7063	18,12	0,3627
Zeólita ZSM 22	0,7069	19,98	0,4007
Zeólita ZSM 35	1,0857	26,54	0,5329
Zeólita ZSM 5	0,5921	34,38	0,6903
Zeólita ITQ-2	2,1319	41,10	0,8320

Em relação aos resultados apresentados na Tabela 9 nota-se que entre os materiais zeolíticos empregados, as zeólitas ITQ-2, ZSM 35 e ZSM 5 podem ser consideradas como melhores suportes para a imobilização, com rendimentos superiores a 25% em relação à quantidade de enzima utilizada no início do processo.

Num contexto geral pode-se verificar que existem vários materiais inorgânicos empregados para imobilização de lipases, entre eles as zeólitas (Yagiz et al., 2007). No entanto, o amplo uso de diferentes substratos e suportes zeolíticos conduz a uma enorme quantidade de dados quantitativos que não podem ser diretamente comparados com os obtidos neste trabalho. A aplicação do processo de adsorção para imobilização de enzimas pode ser qualificado como muito atrativo devido a sua simplicidade. Dessa forma, o uso de materiais zeolíticos apresenta grande interesse, tendo em vista que as zeólitas possuem propriedades potencialmente interessantes, tais como uma grande área superficial (200 a 800m²/g), comportamentos hidrofílicos e hidrofóbicos, podendo apresentar interações eletrostáticas com a possibilidade de diferentes formas de troca iônica, além da característica de resistência química e mecânica. Vantagens adicionais como facilidade de dispersão e recuperação, bem como elevada capacidade de adsorção em água também podem ser interessantes para o uso destes materiais como suportes para imobilização de biomoléculas.

Dessa forma, a composição estrutural e as variâncias das peneiras moleculares (zeólitas) oferecem uma poderosa ferramenta para otimizar as propriedades do catalisador. A principal desvantagem no uso de zeólitas como suporte consiste em suas pequenas dimensões de poro. Levando em conta esta característica, pode-se verificar a dificuldade da enzima migrar para o interior dos canais da matriz zeolítica, impedindo a total eficiência de sua imobilização nestes materiais. Tal fato foi observado nos resultados obtidos neste estudo.

Entretanto, uma abordagem interessante no emprego de zeólitas como suporte para imobilização de enzimas consiste no uso de zeólitas pilarizadas ou deslaminadas (ITQ-2 e ITQ-6), as quais apresentam diâmetros de poros superiores em relação às demais (Macario et al., 2005).

Como pôde ser observado neste trabalho a zeólita ITQ-2 apresentou melhor rendimento de imobilização, provavelmente devido à mesma fornecer maior acessibilidade da enzima comprovando, desta forma a influência da estrutura na utilização de zeólitas como materiais imobilizantes.

Segundo Macario et al. (2005) ao imobilizar uma lipase sobre suportes inorgânicos como zeólitas deve-se levar em consideração a hidrofobicidade do suporte, além do efeito combinado desta variável com as forças de Van der Waals ou forças eletrostáticas, as quais influenciam diretamente a adsorção das enzimas no suporte.

Apesar dos bons resultados obtidos nesta etapa do trabalho, a literatura aponta poucos trabalhos relacionados à imobilização de lipases em zeólitas. Vidinha et al. (2006) utilizaram a técnica de encapsulação sol-gel para imobilização de cutinase em zeólitas A e NaY obtendo um rendimento de imobilização de 41% e 75%, para cada suporte, respectivamente. Yagiz et al. (2007) empregaram hidrotalcita e as zeólitas 13-X, 5A, FM-8 e AW-300 para imobilização da lipase Lipozyme-TL IM por adsorção, obtendo as quantidades de proteína adsorvidas de 13mg/g com eficiência de imobilização de 95,8% para a hidrotalcita e 9mg/g com eficiência de imobilização de 56,1% para as zeólitas empregadas (todas conduziram a comportamentos semelhantes). Frontera et al. (2005) utilizaram silicalite-1 para imobilização por adsorção da lipase comercial

de *Rhizomucor miehei* (Patalase), obtendo um rendimento de imobilização de 59% e 228mg de lipase/g de suporte.

Macario et al. (2005) imobilizaram a lipase de *Rhizomucor miehei* em zeólitas deslaminadas ITQ-2, ITQ-6, Na-Silicalite-1, H-Silicalite-1 e MCM-41 empregando processo de adsorção. Os resultados de imobilização obtidos para estes materiais foram: 74% para o suporte Na-Silicalite-1, 66% H-Silicalite-1, 41% MCM-41, 27% ITQ-2 e 17% quando ITQ-6 foi utilizada como suporte. Knezevic et al. (1998) imobilizaram a lipase de *Candida cylindracea* sobre zeólita Y, obtendo um rendimento de imobilização de 33% e 8,2mg/g de proteína adsorvida. Tavolaro et al. (2007) imobilizaram albumina de soro bovino (BSA) em zeólitas beta, Y e OH-Silicalite-1 por processo de adsorção com rendimentos de imobilização de 79, 77 e 80,2%, respectivamente. Chang e Chu. (2007) imobilizaram lisozima em zeólita NAY extrusada obtendo rendimento de imobilização de 33,3%.

4.2.3 Atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada em zeólitas

No estudo da atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada utilizou-se ácido oléico e etano como substratos. A avaliação da atividade lipásica da enzima livre e imobilizada usando estes substratos foi realizada por titulação com NaOH 0,02 mol/L até pH 11,0. Os resultados obtidos para a reação de esterificação são apresentados na Tabela 10.

De acordo com os dados apresentados na tabela, pode-se verificar uma eficiência maior da atividade catalítica de esterificação para as zeólitas mordenita com uma atividade de 107,25U/g, seguida pelas zeólitas ZSM 22 (52,72U/g) e ZSM 5 (51,13U/g).

Estes resultados mostram que a atividade é influenciada pela composição e porosidade dos materiais e não somente pela quantidade de enzima imobilizada.

Tabela 10. Atividade de esterificação da lipase comercial obtida de pâncreas suíno livre e imobilizada em zeólitas.

Amostra	Atividade de esterificação (U/g)
Enzima livre	739,69
Lipase imobilizada (Mordenita)	107,25
Lipase imobilizada (Zeólita ZSM 22)	52,72
Lipase imobilizada (ZSM 5)	51,13
Lipase imobilizada (Zeólita ITQ-2)	33,50
Lipase imobilizada (Zeólita NaX)	26,58
Lipase imobilizada (Zeólita ZSM 35)	24,67
Lipase imobilizada (Zeólita Y)	9,43

A literatura não apresenta muitos trabalhos relacionados à imobilização de lipases empregando zeólitas como suportes, principalmente no que se refere ao acompanhamento da atividade de esterificação. Dentre os trabalhos disponíveis pode-se citar o de Abdullah et al. (2009), os quais empregaram zeólitas SBA-15 e SBA-15 amino-funcionalizada para imobilização de lipase de *Candida rugosa*, obtendo rendimentos de 76 e 86,6%, respectivamente e uma atividade enzimática de 90% no processo de esterificação empregando citronelol e ácido láurico como substratos. Zeng et al. (2009) empregaram hidrotalcita para imobilização da lipase obtida a partir de *Saccharomyces cerevisiae* por processo de adsorção, obtendo uma retenção enzimática de 95% e atividade lipásica de cerca de 700U/g de suporte

4.3 Resinas de troca iônica

4.3.1 Caracterização parcial das resinas utilizadas na etapa de *screening*

As resinas de troca iônica empregadas na etapa de *screening* de suportes para imobilização da lipase obtida de pâncreas suíno foram Resina Amberlyst 36 e Resina Amberlite XAD-2. As resinas Amberlite-XAD podem apresentar diferentes estruturas químicas e grupos iônicos funcionais característicos. A resina Amberlite XAD-2 é um co-polímero aromático de estireno-divinil-benzeno

de baixa polaridade (μ 0,3) com uma estrutura hidrofóbica (Spagna et al., 1995). A resina Amberlyst 36 é um suporte ácido reticular de poliestireno-divinilbenzeno do íon do ácido sulfônico. Esta resina apresenta boas propriedades físicas e químicas, tais como: porosidade, durabilidade e pureza, sendo resistente a ácidos concentrados, bases e solventes orgânicos, sendo desenvolvida especialmente para catálise heterogênea e tendo, entre suas aplicações, o processo de hidratação de olefinas (www.dow.com/amberlyst/amberlyst_36wet. Acessado 16/08/2010).

A Figura 10 apresenta os difratogramas de raios X das resinas de troca iônica Amberlyst 36 e Amberlite XAD-2, onde se observa que são materiais de estrutura amorfa.

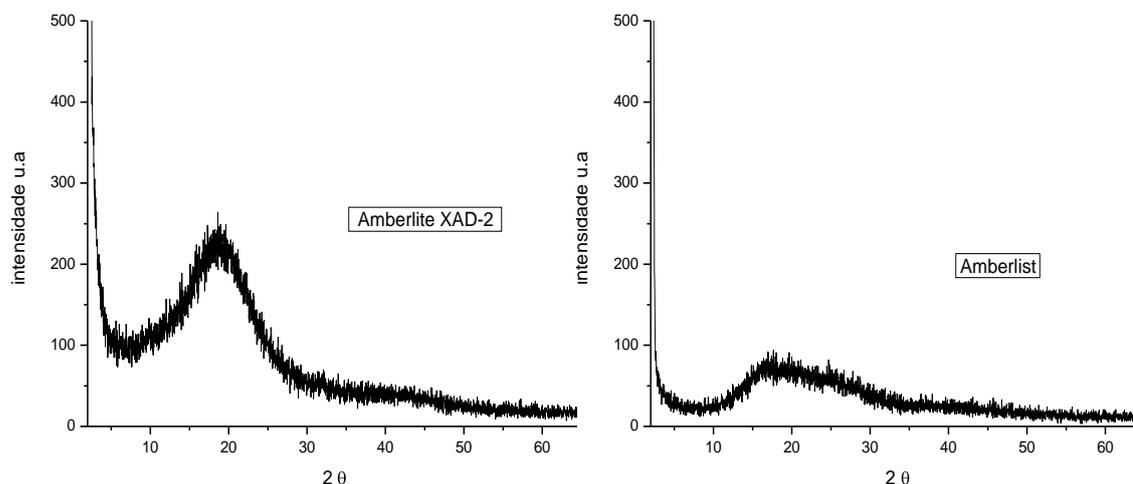


Figura 10. Difratograma de raios-X das resinas de troca iônica Amberlite XAD-2 e Amberlyst-36.

A Tabela 11 apresenta as áreas superficiais das resinas de troca iônica Amberlyst 36 e Amberlite XAD-2. As áreas foram determinadas através do método BET empregando os dados de adsorção de nitrogênio. Observa-se que a XAD2 possui área maior que a A-36.

Tabela 11. Área superficial específica das resinas de troca iônica Amberlyst 36 e Amberlite XAD-2.

Amostra	Área (m ² /g)
Resina Amberlyst 36 (wet)	42,84
Resina Amberlite XAD-2	276,65

4.3.2 Rendimento de imobilização da lipase nas resinas de troca iônica

Assim como realizado para os suportes argilosos e zeolíticos, a determinação da quantidade de enzima imobilizada durante o processo de adsorção física da lipase nos suportes em avaliação nesta etapa foi realizada através de análise por espectrofotometria usando o método de Bradford (1976). Assim como descrito para os demais suportes empregados anteriormente, foi realizado um estudo cinético de adsorção em relação às alíquotas retiradas durante o processo de imobilização nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, além das soluções de entrada e saída.

Tendo como base os dados obtidos nesta análise nos diferentes tempos, foi possível a construção do gráfico do teor de proteína em função do tempo de imobilização. As Figuras 11 e 12 apresentam estes resultados. Pela Figura 11 é possível verificar comportamentos cinéticos de adsorção semelhantes para as duas resinas empregadas, ocorrendo em ambas a imobilização da lipase. No entanto, pode-se verificar que a resina de troca iônica com característica ácida conduziu a melhores resultados de imobilização, apesar de possuir uma área menor .

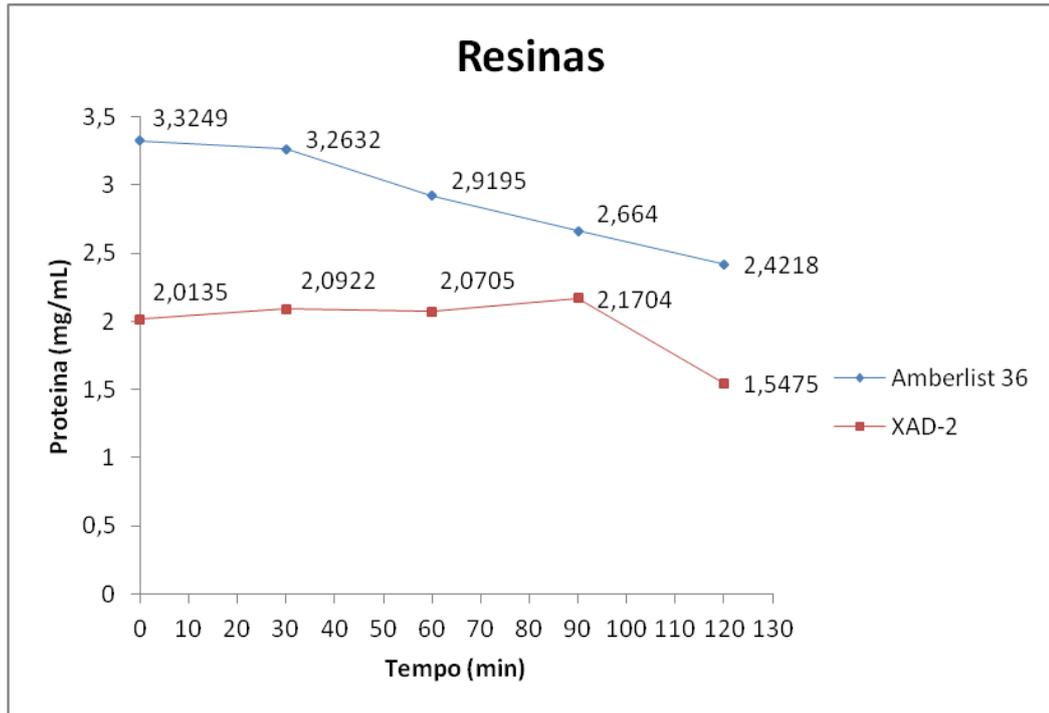


Figura 11. Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em resinas de troca iônica.

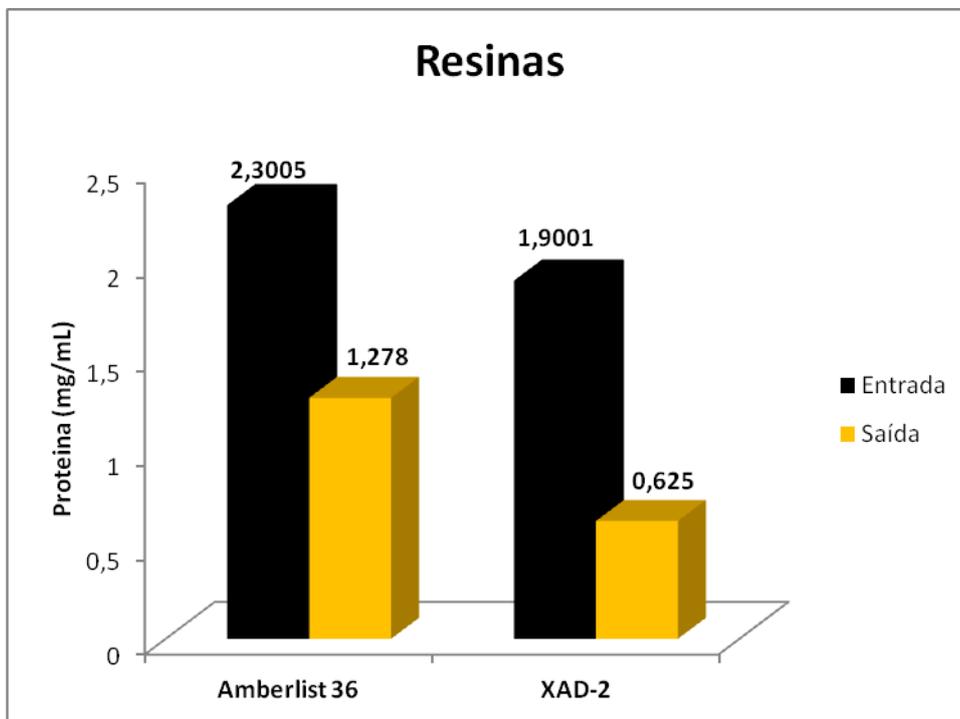


Figura 12. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em resinas de troca iônica antes e após o processo de imobilização.

A Tabela 12 apresenta os resultados relacionados à quantidade de proteína adsorvida, o rendimento da imobilização e a quantidade de lipase imobilizada no processo de imobilização da lipase comercial de pâncreas suíno nas resinas de troca iônica.

Tabela 12. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas resinas.

Amostra	Proteína adsorvida (mg/mL)	Rendimento de imobilização (%)	Lipase imobilizada (g)
Amberlyst 36	0,9031	39,25	0,7930
Amberlite XAD-2	0,4659	24,52	0,4965

Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que a resina de troca iônica com característica ácida (Amberlyst 36) demonstrou melhor capacidade de imobilização da lipase estudada em comparação a resina de troca iônica Amberlite XAD-2, a qual possui características básicas, com um rendimento de quase 40% em relação à quantidade de enzima utilizada no início do processo. Isto parece sugerir que a característica básica da resina reduz as interações entre a enzima e a matriz do suporte. Além disso, a adsorção pode estar ocorrendo predominantemente apenas na superfície externa do suporte devido às grandes dimensões moleculares da enzima em relação ao substrato ou também às fortes interações hidrofóbicas da enzima com a matriz, ocasionando uma mudança conformacional nas estruturas secundária e terciária da molécula de proteína, diminuindo as interações entre os grupos aromáticos do suporte e da enzima; ocorrendo, desta forma, um menor rendimento de imobilização comparado à resina ácida Amberlyst 36.

Spagna et AL. (1995) utilizaram diferentes resinas acrílicas Amberlites XAD (XAD 2, 4, 16, 7 e 8) para imobilização de pectiniliase, obtendo diferentes rendimentos de imobilização (38, 30, 18, 20 e 12%) e diferentes atividades enzimáticas (11,5; 2; 36; 190 e 22U/g). Bagi et al. (1997) utilizaram diferentes materiais (pérolas de poliacrilamida, polietileno tereftalato, alumina e Celite) para

imobilização de lipase de pâncreas suíno obtendo as quantidades de proteína adsorvida de 145, 36, 31 e 32mg/g e atividades catalíticas de 21,87; 360, 86 e 75U/g. Gandhi et al. (1996) empregaram resinas de troca iônica Indion 850 e 860, e Duolite A368 para imobilização da lipase de *Mucor miehei*, obtendo atividades lipásicas de 30, 10 e 17%, respectivamente.

4.3.3 Atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada em resinas de troca iônica

Assim como apresentado nos suportes empregados anteriormente para determinação da atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada utilizou-se ácido oléico e etanol como substratos, conforme metodologia descrita anteriormente. Os resultados obtidos na avaliação da atividade lipásica da enzima livre e imobilizada para a reação de esterificação são apresentados na Tabela 13.

Com relação aos dados apresentados na Tabela 13 percebe-se que ambas as resinas utilizadas como suportes para imobilização apresentaram boa eficiência quanto à atividade catalítica de esterificação, percebendo-se um pequeno aumento da atividade para a resina de troca iônica (Amberlite XAD-2). Isto provavelmente ocorreu devido a esta resina apresentar características básicas, havendo um menor consumo de NaOH durante o processo de titulação e, neste sentido, dando maior acessibilidade da enzima aos substratos (ácido oléico/ etanol) durante o processo catalítico.

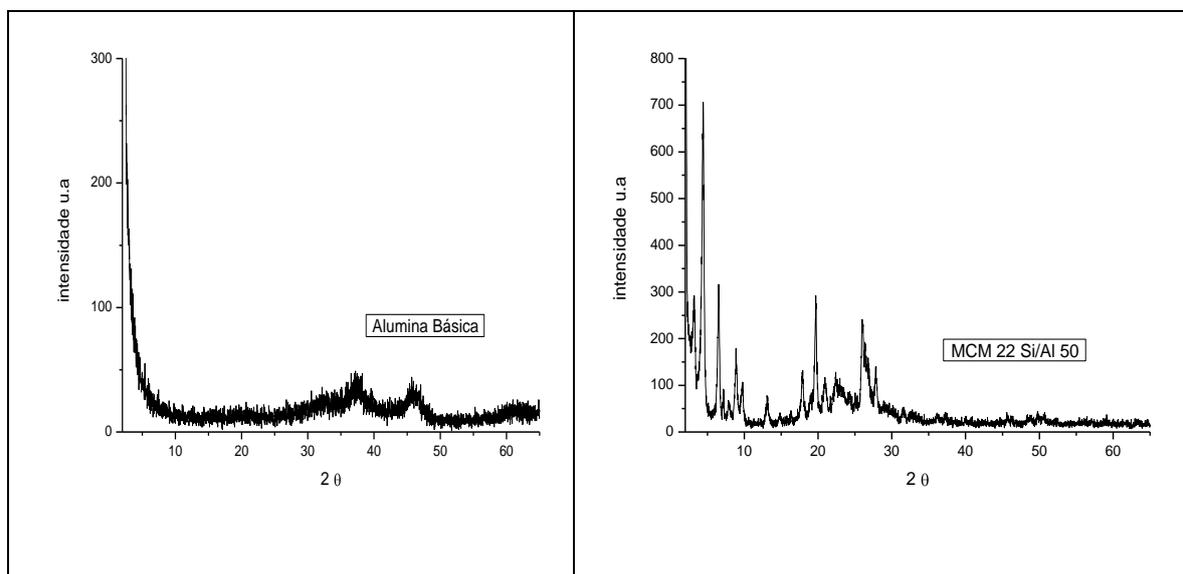
Tabela 13. Atividade de esterificação da lipase comercial obtida de pâncreas suíno livre e imobilizada em resinas de troca iônica.

Amostra	Atividade de esterificação (U/g)
Enzima livre	739,69
Lipase imobilizada (Amberlite XAD-2)	146,02
Lipase imobilizada (Amberlyst 36)	126,16

4.4 Óxidos e Zeólita MCM-22

4.4.1 Caracterização parcial das aluminas e zeólita MCM-22 utilizadas na etapa de *screening*

As aluminas (óxidos) e zeólita MCM-22 com diferentes relações Si/Al empregadas para o estudo de *screening* de suportes para imobilização da lipase obtida de pâncreas suíno foram aluminas comerciais ativadas com características ácida, básica e alumina neutra e zeólita MCM-22 com relações Si/Al (1:15, 1:25 e 1:50). A Figura 13 apresenta os difratogramas de raios X das aluminas comerciais e da zeólita MCM-22 com diferentes relações Si/Al. Através da análise de difração de raios X das três aluminas observa-se que os materiais apresentam um difratograma característico da alumina γ , a qual é caracterizada como um composto pouco cristalino, pois apresenta basicamente modulações de intensidades fracas e difusas. Esse padrão de difração é compatível com o modelo de rede aleatória e tem sido atribuída à tendência de organização a curta distância.



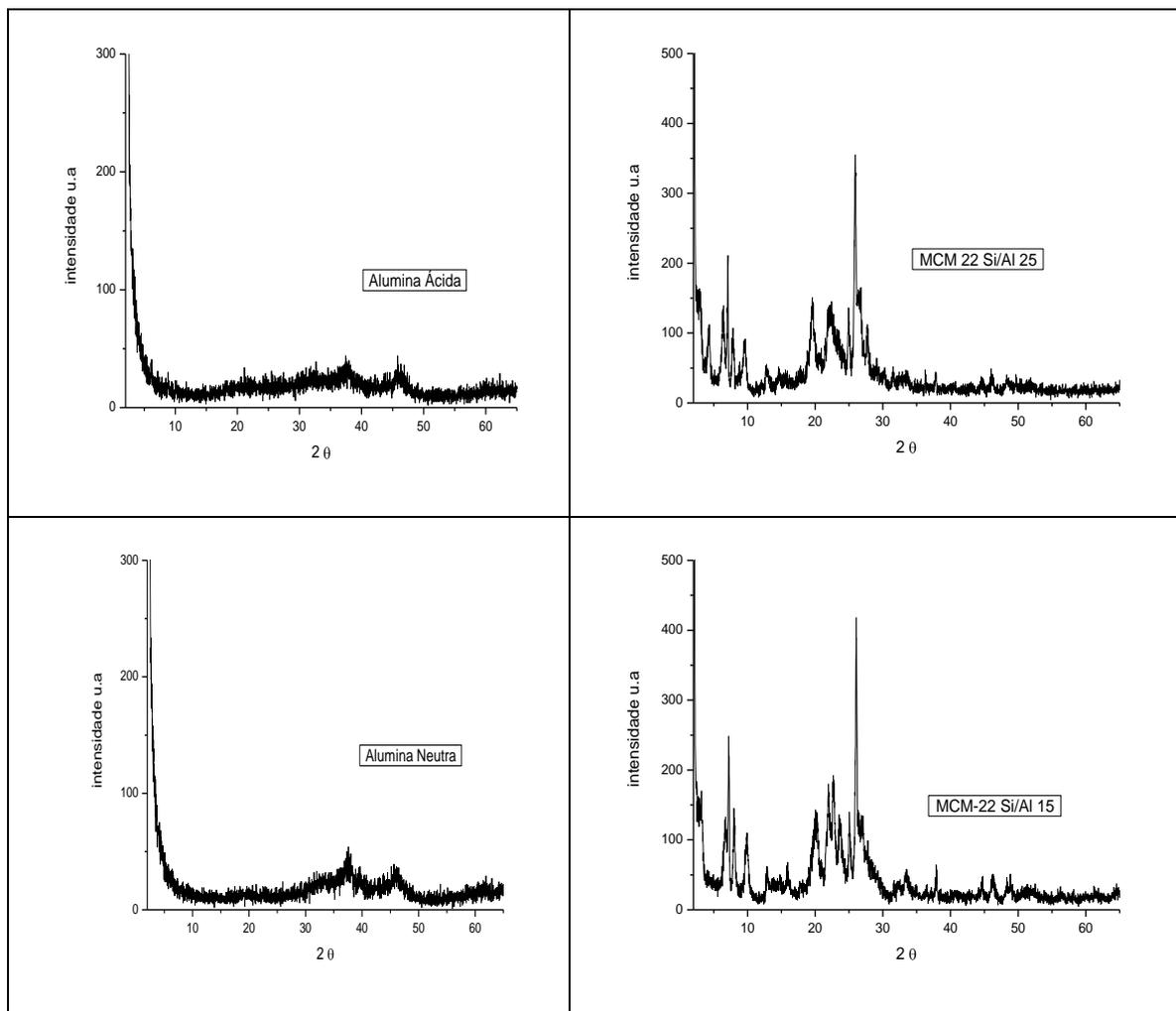


Figura 13. Difratograma de raios-X das aluminas neutra, básica e ácida e das Zeólitas MCM-22 Si/Al (15, 25 e 50).

Os difratogramas das zeólitas MCM-22 apresentaram difratogramas típicos da topologia MWW. Observa-se que com o aumento da relação Si/Al ocorre um aumento da cristalinidade.

A Tabela 14 apresenta as áreas superficiais das aluminas ácida, básica e neutra e das zeólitas MCM-22 com diferentes relações Si/Al (1:15, 1:25 e 1:50). Os valores encontrados estão de acordo com os da literatura, observa-se que as zeólitas com estrutura MCM22 possuem áreas de aproximadamente $450\text{m}^2/\text{g}$ e as aluminas aproximadamente $140\text{m}^2/\text{g}$. A principal diferença destes materiais é sua composição química.

Tabela 14. Área superficial específica das aluminas ácida, básica e neutra e das zeólitas MCM-22 com diferentes relações Si/Al (1:15, 1:25 e 1:50).

Amostras	Área (m²/g)
Alumina Ácida	152
Alumina Básica	141
Alumina Neutra	126
Zeólita MCM 22 Si/Al 15	453
Zeólita MCM 22 Si/Al 25	448
Zeólita MCM 22 Si/Al 50	452

4.4.2 Rendimento de imobilização da lipase nas aluminas e zeólita MCM-22

A determinação da quantidade de enzima imobilizada durante o processo de adsorção física da lipase nos suportes foi realizada através de análises por espectrofotometria usando o método de Bradford (1976) a comprimento de onda de 595nm. As aluminas ativadas são produzidas a partir do hidróxido de alumínio por processo de hidroxilização, resultando em um material feito quase que totalmente de óxido de alumínio. O resultado deste processo é um material altamente poroso com elevada área superficial, podendo chegar a 200m²/g, possuindo, dessa forma, uma larga variedade de aplicações como adsorvente e em processos catalíticos envolvendo adsorção. As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados obtidos nesta etapa. A análise destas figuras permite verificar que o comportamento cinético de adsorção da lipase nos suportes foi semelhante para todos os materiais empregados, ocorrendo desta forma um processo de imobilização eficiente tanto nas aluminas quanto nas zeólita MCM-22 com diferentes relações Si/Al. Entretanto, ao se comparar os dois grupos de materiais percebe-se que a alumina neutra e a zeólita MCM-22 Si/Al (1:25) apresentaram as maiores quantidades de proteína adsorvida.

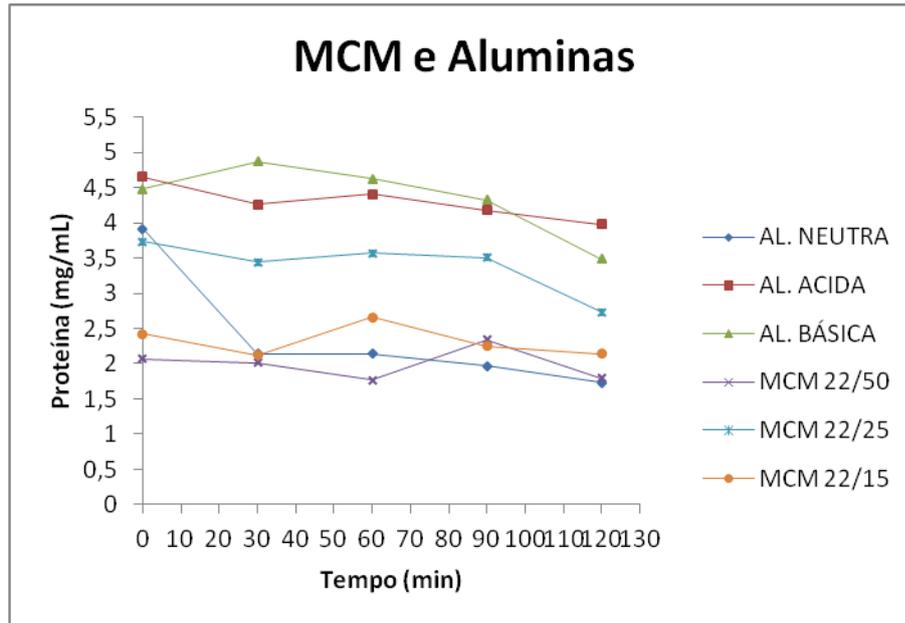


Figura 14. Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em aluminas e zeólita MCM-22.

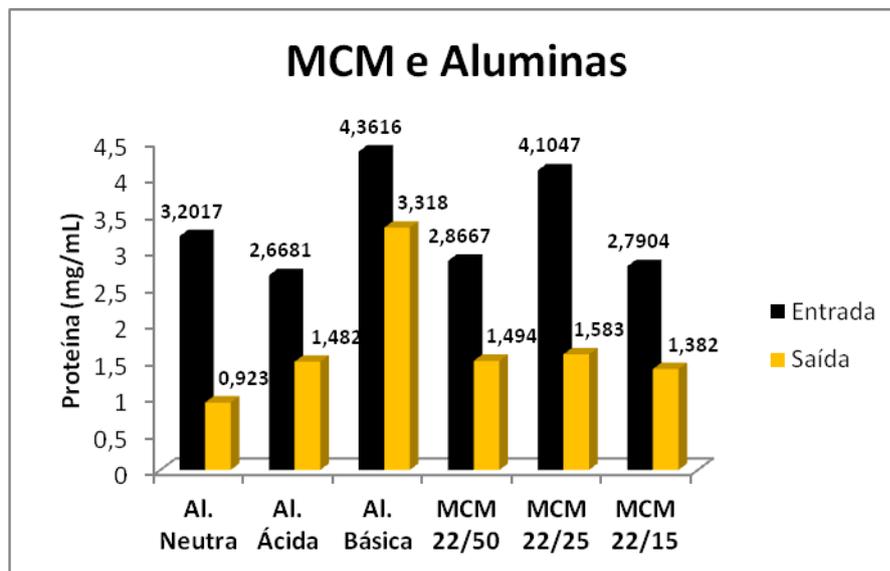


Figura 15. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em aluminas e zeólita MCM-22, antes e após o processo de imobilização.

A Tabela 15 apresenta os resultados relacionados à quantidade de proteína adsorvida, o rendimento da imobilização e a quantidade de lipase imobilizada no processo de imobilização da lipase comercial de pâncreas suíno em aluminas ativadas ácida, básica e alumina neutra e zeólita MCM-22 com diferentes relações Si/AL.

Tabela 15. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas aluminas e zeólita MCM-22.

Amostra	Proteína adsorvida (mg/mL)	Rendimento de imobilização (%)	Lipase imobilizada (g)
Alumina Neutra	2,1858	68,27	1,3740
Alumina Ácida	0,6720	25,18	0,5072
Alumina Básica	0,9879	22,65	0,4566
MCM 22 Si/Al 25	0,9950	24,24	0,4862
MCM 22 Si/Al 15	0,2831	10,14	0,2038
MCM 22 Si/Al 50	0,2704	9,43	0,1883

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que as aluminas demonstraram uma melhor capacidade de imobilização da lipase estudada em comparação com a zeólita MCM-22 com diferentes relações Si/Al, entretanto a alumina neutra pode ser considerada o melhor suporte para imobilização, alcançando um rendimento de imobilização de 68% em relação à quantidade de enzima utilizada no início do processo.

Padmini et al. (1993) imobilizaram a lipase de *Candida lipolytica* por processo de adsorção sobre alumina, obtendo um rendimento de imobilização de 69% em relação à quantidade de enzima inicial utilizada, valor próximo ao obtido neste trabalho. Yiu et al. (2001) utilizaram peneiras moleculares mesoporosas (MCM-41, MCM-48 e SBA15) para a imobilização de tripsina, com uma eficiência de absorção da enzima de mais de 90% para todos os suportes empregados. Dumitriu et al. (2003) utilizaram MCM-22 e MCM-36 para a imobilização de lipase de *Candida antarctica* B. Os rendimentos de imobilização

sobre a superfície externa dos materiais obtidos foram de 20mg/g para MCM-22 e apenas 4mg/g para MCM-36.

Como forma de ilustração, a Figura 16 apresenta o esquema de imobilização de lipases em materiais mesoporosos (Dumitriu et al., 2003).

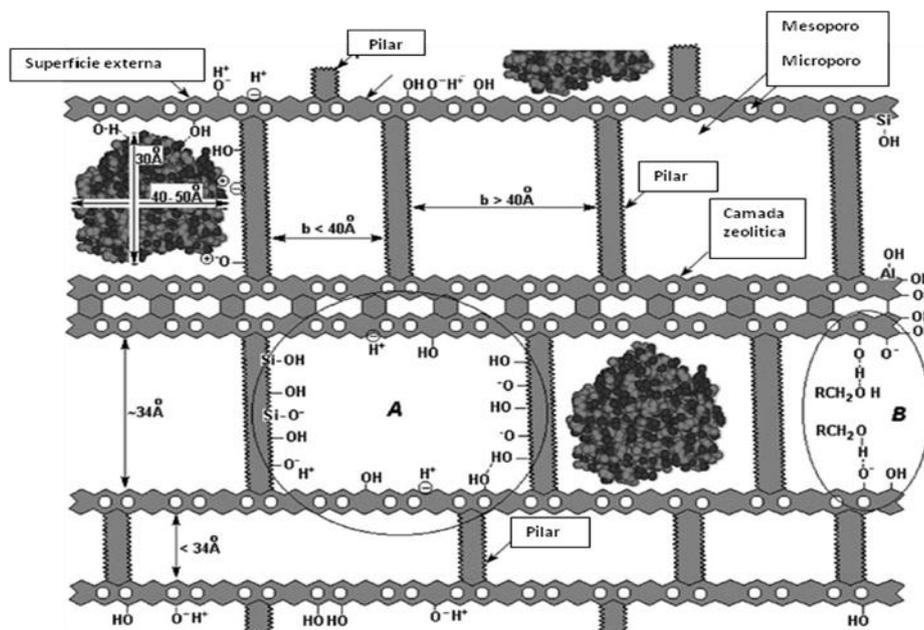


Figura 16. Esquema de imobilização de lipases por adsorção em materiais mesoporosos (Dumitriu et al., 2003).

Como pode-se verificar na figura acima, no processo de adsorção a enzima penetra nas cavidades mesoporosas do suporte se ligando aos seus grupos silanóis.

4.4.3 Atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada em aluminas e zeólita MCM22

Na atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada nos diferentes suportes empregou-se também neste caso ácido oléico e etanol como substratos e os resultados obtidos através da titulação da amostra com NaOH 0,02mol/L até pH 11,0. Os resultados obtidos para a reação de esterificação são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Atividade de esterificação da lipase comercial obtida de pâncreas suíno livre e imobilizada em aluminas ativadas ácida, básica e neutra e zeólita MCM-22 com diferentes relações Si/Al.

Amostra	Atividade de esterificação (U/g)
Enzima livre	739,69
Lipase imobilizada (Alumina Neutra)	118,67
Lipase imobilizada (Alumina Ácida)	0
Lipase imobilizada (Alumina Básica)	0
Lipase imobilizada (MCM 22 Si/Al 25)	91,81
Lipase imobilizada (MCM 22 Si/Al 50)	21,43
Lipase imobilizada (MCM 22 Si/Al 15)	8,79

Tendo em vista os dados apresentados na Tabela 16 percebe-se uma eficiência maior da atividade catalítica de esterificação quando da utilização de alumina neutra como suporte, com uma atividade de 118,67U/g. Acredita-se que a alumina em sua forma neutra, durante o processo de imobilização, forneça uma boa transferência de massa na distribuição da lipase sobre a superfície do suporte, impedindo, desta forma, a agregação de partículas da enzima em uma única porção do suporte e ajudando na sua dispersão no meio reacional de esterificação.

Por outro lado, a enzima imobilizada em aluminas ativadas ácida e básica não apresentou atividade catalítica, provavelmente devido às suas características ácida e básica. Em relação à zeólita MCM-22 Si/Al 25, pode-se observar que a mesma apresentou uma boa atividade de esterificação com uma atividade de 91,81U/g. Em comparação com as outras duas zeólitas (MCM-22 Si/Al 50 e MCM-22 Si/Al 15) empregadas neste estudo, pode-se perceber que a quantidade de alumínio presente na estrutura zeolítica influencia significativamente na acessibilidade da enzima aos substratos (ácido oléico/etanol) durante o processo catalítico.

4.5 Resinas poliméricas

4.5.1 Caracterização parcial das resinas poliméricas utilizadas na etapa de *screening*

As resinas poliméricas (Accurel) empregadas para o estudo de *screening* de suportes para imobilização da lipase obtida de pâncreas suíno foram Accurel XP100, MP100, XP200 e MP1000. A Figura 17 apresenta os difratogramas de raios X das resinas poliméricas empregadas nesta etapa do trabalho. Observa-se que as resinas possuem alguns picos de difração apresentando uma certa cristalinidade. Observam-se semelhanças estruturais principalmente entre as Accurel XP-100 e MP100; e alguma semelhança com a Accurel MP1000. A Accurel XP-200 apresentou picos de difração bem diferenciados das anteriores, indicando uma estrutura diferente. As áreas superficiais determinadas foram relativamente pequenas, $8,91\text{m}^2/\text{g}$ para a Accurel MP-100 e $37,90\text{m}^2/\text{g}$ para a MP-1000.

A Tabela 17 apresenta as áreas superficiais das resinas poliméricas Accurel XP100, MP100, XP200 e MP1000. As áreas foram determinadas através do método de área superficial específica por adsorção de nitrogênio (BET).

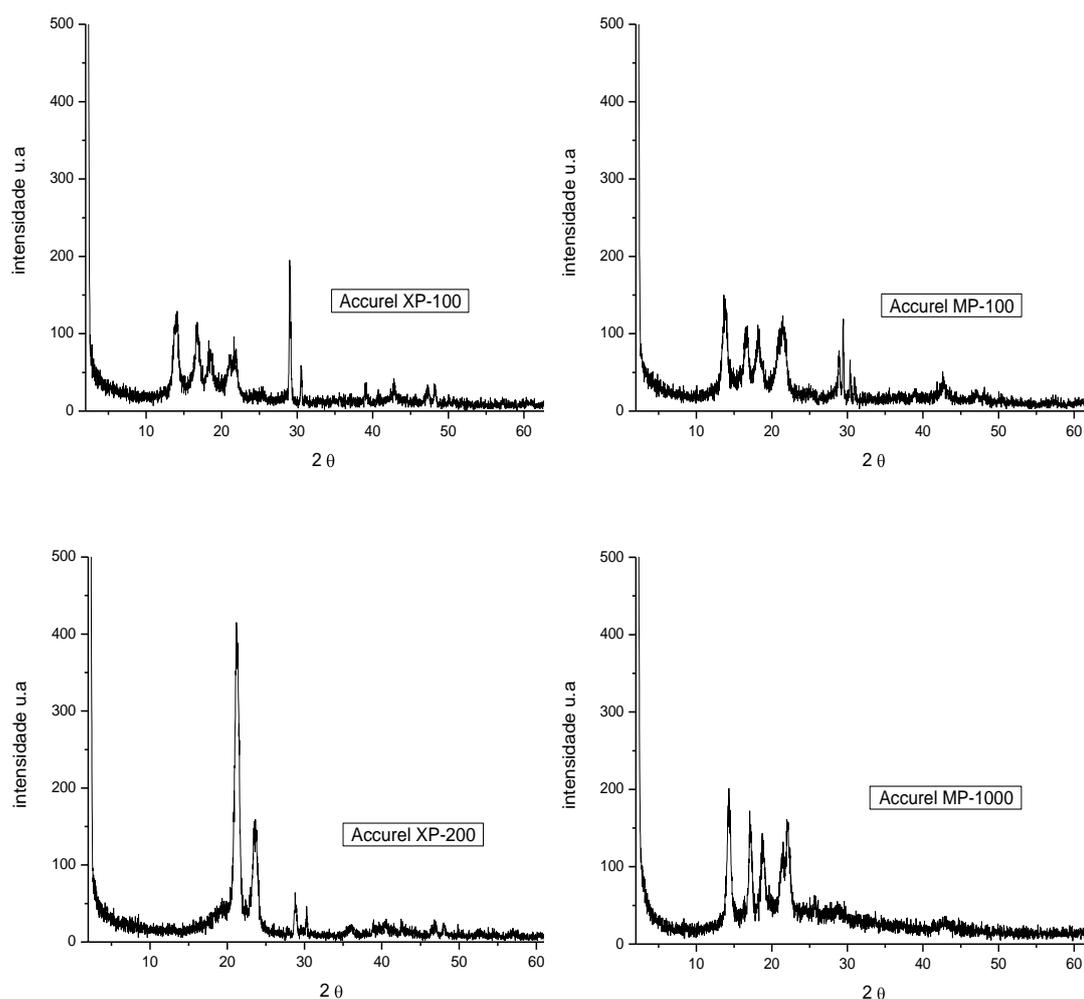


Figura 17. Difratoograma de raios-X das resinas poliméricas Accurel XP100, MP100, XP200 e MP1000.

Tabela 17. Área superficial específica das resinas poliméricas Accurel XP100, MP100, XP200 e MP1000.

Amostras	Área (m ² /g)
Accurel XP-100	ND
Accurel MP-100	8,91
Accurel XP-200	ND
Accurel MP-1000	37,90

ND (não determinado).

4.5.2 Rendimento de imobilização da lipase nas resinas poliméricas

O estudo cinético de adsorção da lipase nas diferentes resinas poliméricas foi realizado através da análise do teor de proteína das alíquotas retiradas durante o processo de imobilização nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, além das soluções de entrada e saída. Através dos dados obtidos pôde-se construir o gráfico do teor de proteína em função do tempo de reação. As Figuras 18 e 19 apresentam os resultados obtidos nesta etapa.

Através da análise destas figuras pode-se verificar que o comportamento cinético de adsorção da lipase nas diferentes resinas poliméricas foi semelhante para todos os materiais testados, tendo ocorrido a imobilização da lipase em todas as resinas poliméricas avaliadas nesta etapa. Entretanto, ao comparar as quatro resinas poliméricas percebe-se que a resina Accurel XP200 e MP1000 apresentaram as maiores quantidades de proteína adsorvidas.

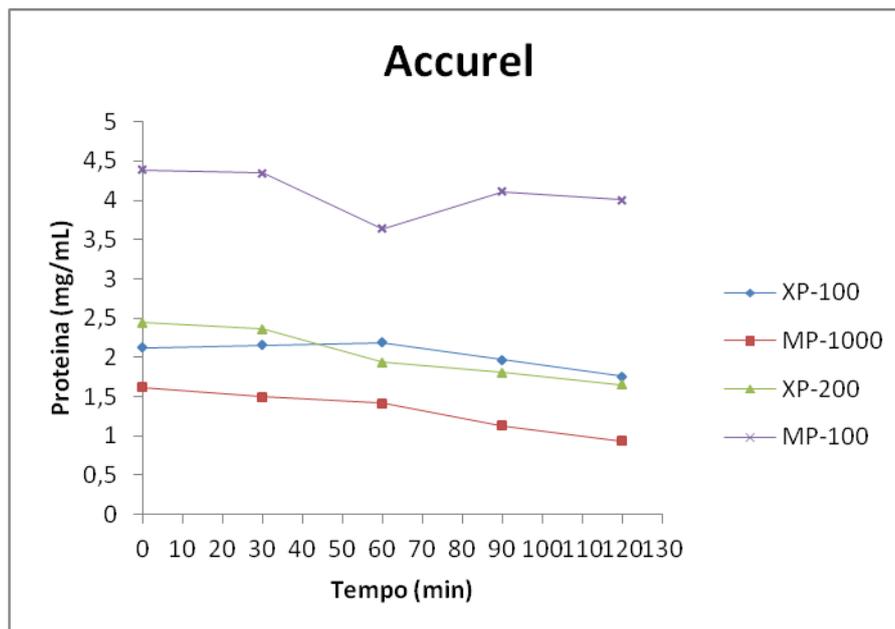


Figura 18. Cinética de adsorção da lipase comercial de pâncreas suíno em resinas poliméricas.

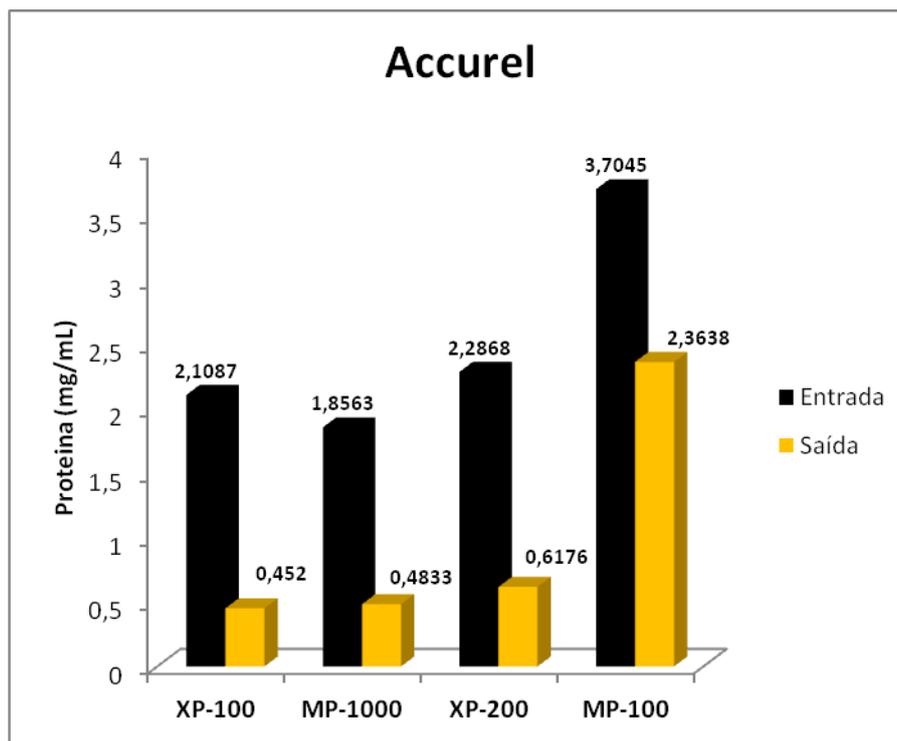


Figura 19. Quantidade da lipase comercial de pâncreas suíno em resinas poliméricas, antes e após o processo de imobilização.

Os resultados obtidos referentes à quantidade de proteína adsorvida, o rendimento da imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas resinas poliméricas (Accurel) empregadas na etapa de *screening* de suportes para imobilização da lipase comercial obtida de pâncreas suíno estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas resinas poliméricas.

Amostra	Proteína adsorvida (mg/mL)	Rendimento de imobilização (%)	Lipase imobilizada (g)
Accurel MP1000	0,6825	36,76	0,7372
Accurel XP200	0,7918	34,62	0,6960
Accurel XP100	0,4285	20,32	0,4073
Accurel MP100	0,3813	10,29	0,2064

Os resultados apresentados na Tabela 18 mostram que entre as resinas poliméricas estudadas, a Accurel MP1000 e XP200 demonstraram uma boa capacidade de imobilização da lipase, alcançando rendimentos de imobilização superiores a 34% em relação à quantidade de enzima utilizada no início do processo. Isso deve-se a uma maior estabilidade em função das interações químicas e físicas entre o suporte estudado e as moléculas de enzima, auxiliando também em uma dispersão mais homogênea da enzima sobre a superfície do suporte, conduzindo assim a um processo mais efetivo de imobilização. A Accurel MP100 apresentou o menor rendimento, provavelmente devido à sua baixa área superficial bem como a uma menor interação entre as moléculas da enzima e a matriz do suporte.

Segundo Villeneuve et al. (2000), as resinas poliméricas como Accurel EP100 (atualmente Accurel MP1000), constituídas por polipropileno e materiais contendo grupos hidrofóbicos de ligações como octil-agarose são exemplos de suportes que vêm se destacando como sendo apropriados à imobilização de lipases. Dentre os trabalhos encontrados na literatura pode-se citar o de Kaewthong et al. (2005), os quais imobilizaram a lipase PS (Amano) em suportes Accurel. Os autores obtiveram rendimentos de 37,16% empregando Accurel EP100 (<200µm) e 31,10% em Accurel EP100 (200-400µm). Estes resultados da literatura podem ser considerados comparáveis aos obtidos neste trabalho para o mesmo suporte.

Menoncin et al. (2009) utilizaram Accurel EP100 e carvão ativado para imobilização de uma lipase bruta microbiana produzida por *Penicillium verrucosum* por processo de adsorção, apresentando retenção de 368,1 e 382,5% e rendimentos de imobilização de 11,7 e 30,4%, para cada um dos suportes, respectivamente. Kartal et al. (2009) imobilizaram lipase de pâncreas suíno em resina glidicil metacrilato incorporado em PVA e apenas em PVA. Após o processo de imobilização as atividades enzimáticas obtidas foram de 66 e 25U/mg e rendimentos de 58 e 22%, respectivamente. Serralha et al. (2004) utilizaram a resina polimérica Accurel PA6 e zeólita Y para imobilização de cutinase, obtendo as melhores atividades específicas de 15,2U/mg para a resina e 25,1U/mg para a zeólita. Gonçalves et al. (1997) também utilizaram os

mesmos suportes testados aqui, obtendo rendimentos de imobilização de 69% na zeólita e 30% na Accurel. As atividades hidrolíticas para estes suportes foram de 91,7 e 111U/g, respectivamente. Yang et al. (2006) imobilizaram lipase de *Candida* sp. 99-125 em diferentes resinas poliméricas macroporosas (NKA9, AB8, H103, D4020 e NKA) por método de adsorção. Os rendimentos de imobilização obtidos pelos autores foram respectivamente de 16,84; 62,06; 84,13; 65,80; e 72,85%; apresentando atividades de 10,5; 38,9; 16,9; 63,8 e 26U/g de resina, respectivamente.

4.5.3 Atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada em resinas poliméricas

No estudo da atividade lipásica de esterificação da enzima livre e imobilizada empregando os suportes Accurel XP100, MP100, XP200 e MP1000 foram usados os substratos ácido oléico e etanol e a atividade de esterificação foi determinada conforme metodologia descrita anteriormente. Os resultados obtidos para a reação de esterificação obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 19. Com relação aos dados apresentados na Tabela 19 percebe-se que a lipase adsorvida sobre a resina polimérica Accurel XP100 apresentou a maior atividade catalítica de esterificação em comparação com as outras três resinas. Pode-se portanto inferir que a Accurel XP100 proporcionou maior acessibilidade da enzima aos substratos (ácido oléico/ etanol), conduzindo a maiores atividades de esterificação.

Tabela 19. Atividade de esterificação da lipase comercial obtida de pâncreas suíno livre e imobilizada em resinas poliméricas.

Amostra	Atividade de esterificação (U/g)
Enzima livre	739,69
Lipase imobilizada (Accurel XP-100)	109,73
Lipase imobilizada (Accurel MP-100)	77,59
Lipase imobilizada (Accurel XP-200)	73,95
Lipase imobilizada (Accurel MP-1000)	58,20

Entretanto, ao se comparar os rendimentos de imobilização para os mesmos suportes percebe-se que a Accurel XP-200 e MP-1000 apresentaram atividades de esterificação com comportamento inverso aos rendimentos obtidos. Provavelmente este comportamento deva-se ao fato de a enzima apresentar uma forte ligação química ou atração eletrostática com esses suportes, que acabaram não liberando a enzima para o meio reacional durante o processo de medida de atividade de esterificação.

4.6 Otimização do processo de imobilização

Após o estudo de imobilização enzimática, quantificação de proteína e análise da atividade de esterificação da lipase imobilizada utilizando os 25 diferentes suportes subdivididos em argilas, zeólitas, óxidos, resinas de troca-iônica e resinas poliméricas, três suportes foram selecionados para estudos de otimização do processo de imobilização, todos pertencentes ao grupo das argilas.

Segundo alguns autores (Secundo et al., 2008; Kloprogge et al., 1999; Yesiloglu, 2005), entre os vários suportes inorgânicos utilizados para a imobilização de enzimas, mais especificamente lipases, as argilas e materiais relacionados apresentam propriedades potencialmente interessantes, tais como comportamento hidrofóbico ou hidrofílico, interações eletrostáticas, resistência mecânica, química e bacteriana, para sua aplicação como suporte para imobilização de biomoléculas.

Outra vantagem do uso de argilas como suportes para imobilização consiste na presença de grupos silanol que, após ativação por diferentes grupos funcionais, atuam como sítios de ligação para espécies bioativas.

Além disso, as argilas possuem a possibilidade de serem sintetizadas, podendo, dessa forma, fornecer uma série reprodutível de materiais inorgânicos sólidos cujas propriedades físicas e/ou químicas podem ser alteradas de forma sistemática para identificar o suporte inorgânico mais adequado para uma determinada aplicação como suporte biocatalítico.

Por essa razão, a síntese de algumas argilas como bentonitas e esmectitas torna-se um assunto de relevância científica, devido à produção de

argilas com alta pureza química e a capacidade de ajustar a sua composição e estrutura para as mais diversas aplicações tais como: clarificação de tintas e óleos minerais, fabricação de cosméticos e produtos farmacêuticos e, no caso particular deste estudo, a imobilização de lipases. Segundo Yesiloglu (2005) a bentonita é uma matriz barata para a imobilização de enzimas e tem sido freqüentemente utilizada para esse fim. Além do seu baixo custo, a bentonita possui várias vantagens para utilização como suporte, incluindo a sua baixa toxicidade e reatividade química, permitindo, facilmente, desta forma, a fixação e permanência das enzimas sob sua estrutura.

A bentonita é uma partícula de argila mineral composta de 2 folhas tetraédricas de Si e uma central octaédrica de Al, unidas entre si por átomos de oxigênio comuns às folhas. Apresenta uma granulometria muito fina (inferior a 0,03% do grão médio da caulinita) que geralmente aumenta de volume de modo substancial em meio aquosos. Consiste principalmente de montmorillonita (de 60 a 80%), podendo conter outras argilas em menor proporção (normalmente, illita e caulinita) além de quartzo, feldspatos, pirita ou calcita (Rossetto et al., 2009).

A Tabela 20 apresenta o confronto de dados obtidos na etapa anterior, que levaram à seleção dos três suportes empregados na etapa de otimização do processo de imobilização da lipase de pâncreas de porco.

Tabela 20. Rendimento de imobilização X Atividade de esterificação – Etapa de *screening* de suportes para imobilização da lipase de pâncreas de porco.

Amostra	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade de Esterificação (U/g)
Argila KSF	76,32	15,96
Alumina Neutra	68,27	118,67
Argila Poço A	52,01	129,13
Argila K-10	46,63	152,25
Amberlyst 36	39,25	126,16
Argila Poço A Pil.	29,98	154,61
Amberlite XAD-2	24,52	146,03

Os suportes selecionados para otimização do processo de imobilização da lipase foram: Argila montmorillonita KSF, Argila montmorillonita natural Poço A e Argila montmorillonita Poço A pilarizada. Estes materiais foram selecionados tendo em vista os melhores resultados obtidos na etapa de *screening* de suportes, como sendo: KSF como suporte que conduziu ao melhor rendimento de imobilização; Poço A Pilarizada como suporte relacionado à melhor atividade de esterificação e Poço A como tendo bom rendimento de imobilização e atividade de esterificação significativa.

4.6.1 Otimização de variáveis dos suportes selecionados

Para a otimização do processo de imobilização da lipase de pâncreas de porco nos três suportes selecionados anteriormente, avaliou-se, nesta etapa, o efeito do tempo de imobilização e a relação enzima/suporte. Os tempos de imobilização estudados foram 60, 120 e 180 minutos. As relações enzima/suporte (g/g) empregadas no estudo foram 2:2, 2:1 e 2:0,5.

Rendimento de imobilização da lipase nas argilas em diferentes tempos e relações enzima:suporte

Durante o estudo de imobilização dos suportes selecionados realizou-se a retirada de alíquotas nos tempos iniciais e finais de imobilização, além da retirada de alíquotas das soluções de entrada e saída para determinação da quantidade de enzima imobilizada durante o processo, do teor de proteína adsorvido e rendimento de imobilização, conforme metodologias descritas anteriormente.

A Tabela 21 e Figura 20 apresentam os dados referentes à relação enzima/suporte 2:1 (g/g). Observa-se que a argila montmorillonita Poço A apresenta um aumento no rendimento de imobilização com relação ao aumento de tempo. Nas argilas KSF e Poço A Pilarizada este mesmo comportamento não foi verificado, devido haver uma possível saturação da enzima na capacidade de adsorção do suporte.

Tabela 21. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização, utilizando relação enzima:suporte de 2:1.

Amostra	Tempo (min)	Proteína Adsorvida (mg/mL)	Rendimento de Imobilização (%)	Lipase Imobilizada (g)
Poço A	60	0,5864	14,22	0,2850
Poço A	120	1,0531	23,93	0,4798
Poço A	180	1,1262	26,17	0,5237
Poço A Pil.	60	0,8633	18,64	0,3739
Poço A Pil.	120	1,3922	33,87	0,6784
Poço A Pil.	180	0,703	26,53	0,5335
KSF	60	0,8253	27,52	0,5512
KSF	120	0,5662	20,31	0,4070
KSF	180	0,7513	26,64	0,5343

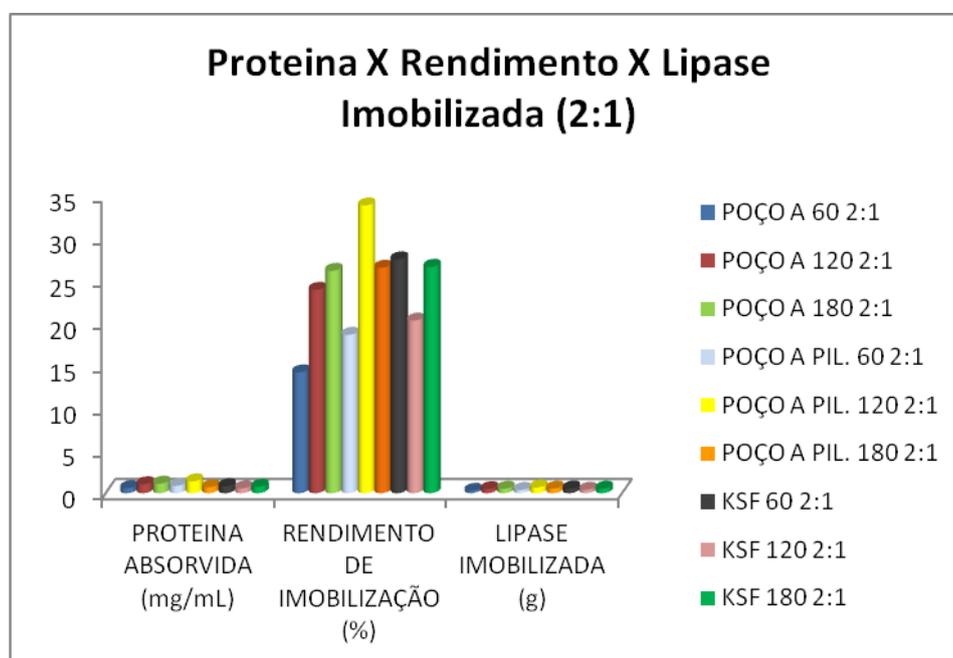


Figura 20. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte de 2:1.

A Tabela 22 e Figura 21 apresentam os dados referentes à quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada para os três suportes empregados nesta etapa nos diferentes tempos de imobilização e relação enzima/suporte 2:0,5 (g/g). Observa-se que em todas as argilas ocorreu a saturação da enzima na superfície dos suportes após 120 minutos de imobilização. Tal comportamento provavelmente ocorreu devido à grande quantidade de enzima empregada na relação estudada. Segundo os resultados apresentados após 120 minutos, a enzima é liberada de volta ao meio reacional. Ao comparar as três argilas no tempo de 120 minutos de imobilização percebe-se que o melhor rendimento de imobilização foi observado para a argila Poço A Pilarizada, fato relacionado à maior área superficial deste suporte comparado aos demais.

Tabela 22. Quantidade de proteína adsorvida , rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização, utilizando relação enzima:suporte de 2:0,5.

Amostra	Tempo (min)	Proteína Adsorvida (mg/mL)	Rendimento de Imobilização (%)	Lipase Imobilizada (g)
Poço A	60	0,7537	11,77	0,2365
Poço A	120	2,2210	32,52	0,6508
Poço A	180	0,6385	22,82	0,4590
Poço A Pil.	60	0,4443	20,87	0,4190
Poço A Pil.	120	0,7628	38,23	0,7672
Poço A Pil.	180	0,8339	32,38	0,6483
KSF	60	0,7922	27,92	0,5597
KSF	120	0,9124	30,22	0,6056
KSF	180	0,3355	11,30	0,2262

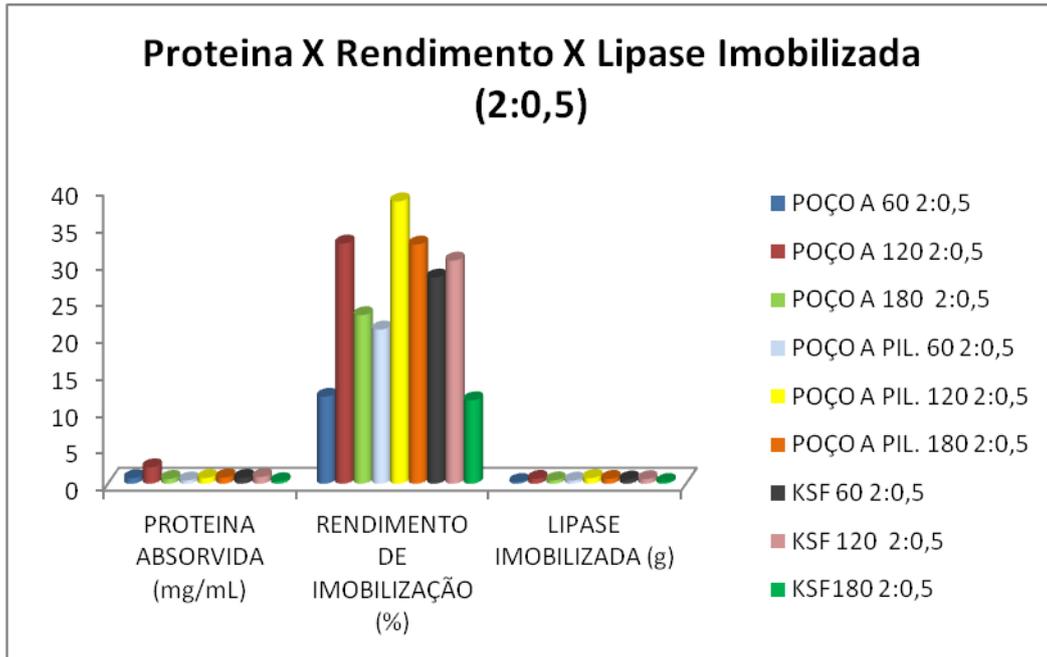


Figura 21. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte de 2:0,5.

A Tabela 23 e Figura 22 apresentam os resultados em relação à quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilização para os três suportes empregados nos diferentes tempos de imobilização e relação enzima:suporte 2:2 (g/g)

Observa-se que ocorre um aumento gradativo do rendimento de imobilização em relação ao tempo para as argilas Poço A e Poço A Pilarizada, devido à relação enzima/suporte ser neste caso equiparável (mesma quantidade de enzima e suporte havendo uma melhor distribuição da enzima sobre a superfície dos suportes). Com relação à argila KSF o maior rendimento de imobilização foi alcançado já primeira hora de imobilização. Após esse período ocorre um processo de dessorção, através da liberação da enzima presa no suporte para o meio reacional. Ao comparar a quantidade de enzima imobilizada nos três suportes nos tempos de 120 e 180 minutos percebe-se que a argila Poço A pilarizada apresentou maior rendimento de imobilização, provavelmente devido ao fato de apresentar uma maior área superficial, como será apresentado posteriormente.

Tabela 23. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos relação 2:2.

Amostra	Tempo (min)	Proteína Adsorvida (mg/mL)	Rendimento de Imobilização (%)	Lipase Imobilizada (g)
Poço A	60	0,6033	17,62	0,3529
Poço A	120	0,7464	19,83	0,3974
Poço A	180	1,2518	29,74	0,5962
Poço A Pil.	60	0,5400	20,47	0,4103
Poço A Pil.	120	0,6045	21,94	0,4397
Poço A Pil.	180	0,7573	33,09	0,6637
KSF	60	0,7989	34,76	0,7004
KSF	120	0,5772	15,77	0,318
KSF	180	0,2992	12,70	0,2543

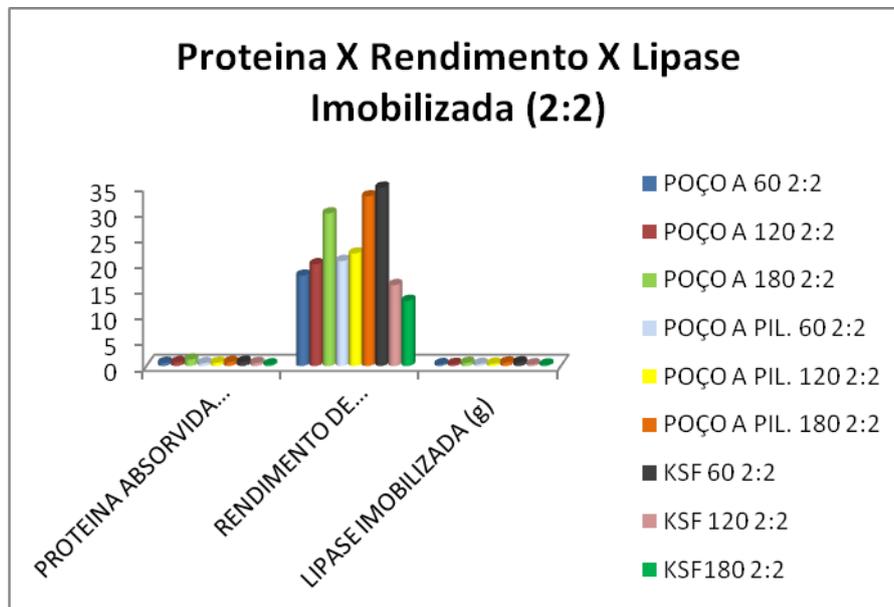


Figura 22. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte de 2:2.

A literatura mostra que o tipo de suporte empregado, a quantidade de enzima utilizada e o tempo de contato enzima/suporte apresentam grande influência nos rendimentos de imobilização. Tzialla et AL. (2010) imobilizaram a lipase de *Candida antarctica* sobre argilas esmectitas (Laponita, SWy-2 e Kunipia). Os melhores rendimentos de imobilização obtidos para as três esmectitas foram de 85% (laponita), 83% (Kunipia) e 83% (SWy-2) e a quantidade de proteína imobilizada nestes três suportes ficaram em torno de 17%. Li et al. (2009, 2009) empregaram zeólitas SBA15 tipo fibra e bastão como suporte para a imobilização de lipase de pâncreas suíno, obtendo atividades enzimáticas de 155,37 e 34,03U/g, respectivamente, em pH 7, e rendimentos de imobilização entre 8,9 e 10,1% nos tempos de 2 e 3 horas de imobilização, chegando até a rendimentos de adsorção de 50% num período de 12 horas de imobilização, entretanto com menores atividades enzimáticas (decaindo de 214,76U/g em 3 horas de imobilização para 47,67U/g após 12 horas de imobilização) mostrando, assim, como nos resultados obtidos neste trabalho que, dependendo do tipo de suporte empregado e quantidade de enzima utilizada, o rendimento de imobilização aumenta com o tempo até atingir um ponto de saturação como demonstrado nas Tabelas 21 e 22.

Como forma de compilação dos resultados apresentados na etapa de otimização do processo em termos do rendimento de imobilização, a Tabela 24 apresenta os resultados comparativos em ordem decrescente em relação à quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada para os três suportes empregados, nos diferentes tempos de imobilização e relações enzima/suporte (g/g). Ao comparar todos os tempos de imobilização e relações enzima/suporte das três argilas empregadas percebe-se um comportamento variado no rendimento da imobilização, fato esperado uma vez que foram correlacionadas diferentes condições de adsorção (tempo e quantidade de enzima). Entretanto, a argila Poço A Pilarizada conduziu a bons rendimentos de imobilização em todas as variações enzima/suporte e nos tempos de 120 e 180 minutos. Este resultado está relacionado, provavelmente, à elevada área superficial, boa capacidade de adsorção e maior interação química

com a enzima, relacionado a uma ligação mais forte da enzima com os grupos hidrofóbicos ligantes do suporte.

Tabela 24. Quantidade de proteína adsorvida, rendimento de imobilização e quantidade de lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização e relações enzima:suporte.

Amostra	Tempo (min)	Relação enzima:suporte	Proteína Adsorvida (mg/mL)	Rendimento Imobilização (%)	Lipase Imobilizada (g)
Poço A Pil.	120	2:0,5	0,7628	38,23	0,7672
KSF	60	2:2	0,7989	34,76	0,7004
Poço A Pil.	120	2:1	1,3922	33,87	0,6784
Poço A Pil.	180	2:1	0,7573	33,09	0,6637
Poço A	120	2:0,5	2,2210	32,52	0,6508
Poço A Pil.	180	2:0,5	0,8339	32,38	0,6483
KSF	120	2:0,5	0,9124	30,22	0,6056
Poço A	180	2:2	1,2518	29,74	0,5962
KSF	60	2:0,5	0,7922	27,92	0,5597
KSF	60	2:1	0,8253	27,52	0,5512
KSF	180	2:1	0,7513	26,64	0,5343
Poço A Pil.	180	2:1	0,7030	26,53	0,5335
Poço A	180	2:1	1,1262	26,17	0,5237
Poço A	120	2:1	1,0531	23,93	0,4798
Poço A	180	2:0,5	0,6385	22,82	0,4590
Poço A Pil.	120	2:2	0,6045	21,94	0,4397
Poço A Pil.	60	2:0,5	0,4443	20,87	0,4190
Poço A Pil.	60	2:2	0,5400	20,47	0,4103
KSF	120	2:1	0,5662	20,31	0,4070
Poço A	120	2:2	0,7464	19,83	0,3974
Poço A Pil.	60	2:1	0,8633	18,64	0,3739
Poço A	60	2:2	0,6033	17,62	0,3529
KSF	120	2:2	0,5772	15,77	0,3180
Poço A	60	2:1	0,5864	14,22	0,2850
KSF	180	2:2	0,2992	12,70	0,2543
Poço A	60	2:0,5	0,7537	11,77	0,2365
KSF	180	2:0,5	0,3355	11,30	0,2262

Dessa forma, a argila Poço A Pilarizada apresenta grande potencial para ser utilizada como suporte para imobilização de lipases, apresentando-se como um adsorvente de baixo custo, disponível naturalmente e apresentando alta capacidade de expansão.

Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos e relações enzima/suporte

A determinação da atividade catalítica da lipase imobilizada nos suportes selecionados foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente. A avaliação da atividade de esterificação da enzima imobilizada usando ácido oléico e etanol como substratos foi realizada por titulação com NaOH 0,02mol/L até pH 11,0. Os resultados obtidos nesta etapa nos diferentes tempos estudados e relação suporte:enzima 2:1 (g/g) são apresentados na Figura 23.

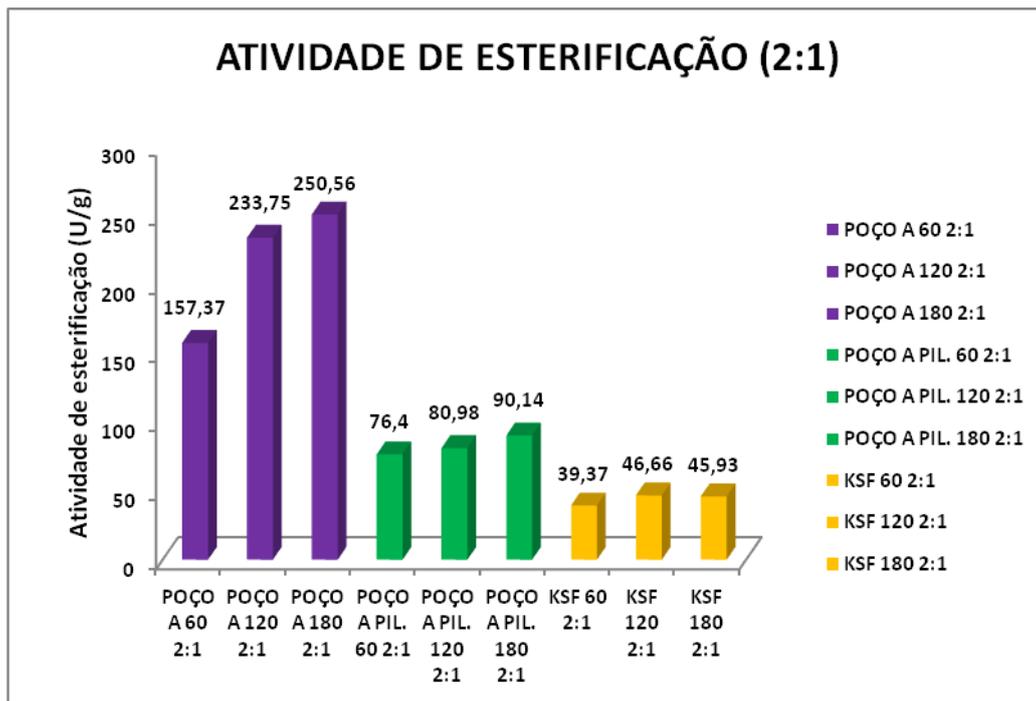


Figura 23. Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte 2:1.

A Figura 24 apresenta os resultados de atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada nas argilas montmorillonitas nos diferentes tempos estudados e relação suporte:enzima 2:0,5 (g/g).

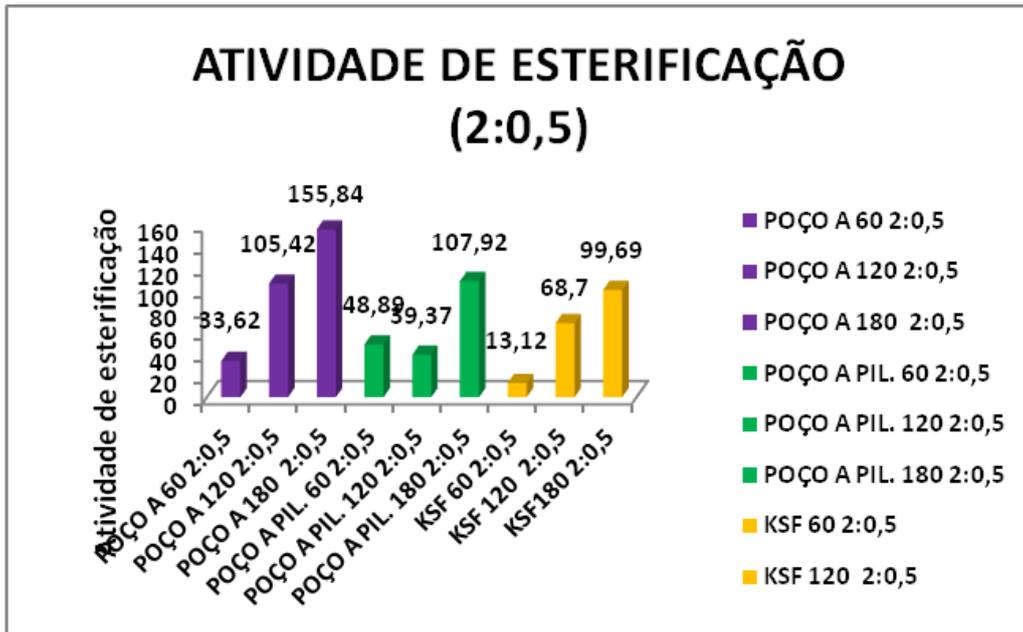


Figura 24. Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte 2:0,5.

Os resultados referentes à atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização e relação enzima:suporte 2:2 (g/g) são mostrados na Figura 25.

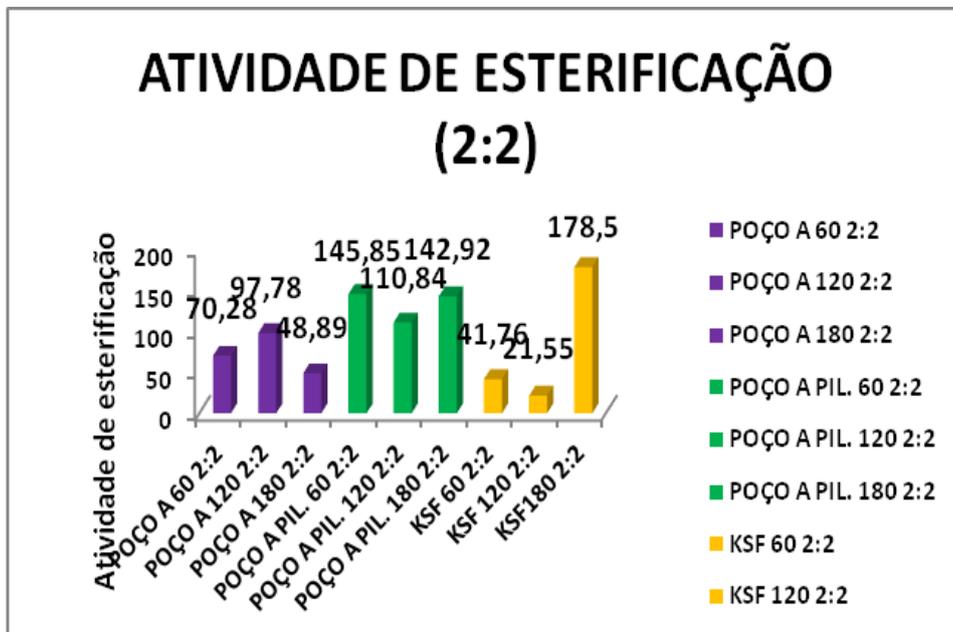


Figura 25. Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos, utilizando relação enzima:suporte 2:2.

A Tabela 25 apresenta os resultados comparativos, referentes às três figuras apresentadas anteriormente, em ordem decrescente de atividade catalítica de esterificação da lipase imobilizada nos suportes argilosos Poço A natural, Poço A pilarizada e KSF nos diferentes tempos de imobilização e relações enzima:suporte.

Tabela 25. Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização e relações enzima:suporte.

Amostra	Tempo (min)	Relação enzima:suporte (g/g)	Atividade de Esterificação (U/g)
Poço A	180	2:1	250,56
Poço A	120	2:1	233,75
KSF	180	2:2	178,50
Poço A	60	2:1	157,37
Poço A	180	2:0,5	155,84
Poço A Pil.	60	2:2	145,85
Poço A Pil.	180	2:2	142,92
Poço A Pil.	120	2:2	110,84
Poço A Pil.	180	2:0,5	107,92
Poço A	120	2:0,5	105,42
KSF	180	2:0,5	99,69
Poço A	120	2:2	97,78
Poço A Pil.	180	2:1	90,14
Poço A Pil.	120	2:1	80,98
Poço A Pil.	60	2:1	76,40
Poço A	60	2:2	70,28
KSF	120	2:0,5	68,70
Poço A	180	2:2	48,89
Poço A Pil.	60	2:0,5	48,89
KSF	120	2:1	46,66
KSF	180	2:1	45,93
KSF	60	2:2	41,76
Poço A Pil.	120	2:0,5	39,37
KSF	60	2:1	39,37
Poço A	60	2:0,5	33,62
KSF	120	2:2	21,55
KSF	60	2:0,5	13,12

4.6.2 Comparação entre o rendimento de imobilização e a atividade catalítica da lipase imobilizada nas diferentes argilas

A Tabela 26 apresenta uma compilação geral dos resultados obtidos referentes à atividade de esterificação da lipase imobilizada nos suportes

argilosos e o rendimento de imobilização em cada material, nos diferentes tempos de imobilização e relações enzima:suporte (g/g) estudados.

4.6.3 Caracterização dos suportes pré-selecionados: Argila montmorillonita KSF, Argila montmorillonita natural Poço A e Argila montmorillonita Poço A pilarizada

Nesta etapa, uma caracterização mais aprofundada dos materiais empregados como suporte de imobilização na otimização do processo foi realizada. As análises foram realizadas nas seguintes condições experimentais, de acordo com os melhores resultados obtidos e apresentados nos itens anteriores:

- Argila montmorillonita natural Poço A, 180 minutos de imobilização, razão mássica 2:1 (enzima:suporte),
- Argila montmorillonita Poço A calcinada e pilarizada, 60 minutos de imobilização, razão mássica 2:2 (enzima:suporte) e,
- Argila montmorillonita comercial KSF, 180 minutos de imobilização, razão mássica 2:2 (enzima:suporte).

As análises empregadas para este estudo de caracterização foram Difração de Raios-X, Microscopia Eletrônica de Varredura, Análise Textural por Adsorção de N₂, Espectroscopia de Infravermelho e Análise Termogravimétrica. Os resultados obtidos nestas análises são apresentados a seguir.

Tabela 26. Rendimento de imobilização versus Atividade de esterificação da lipase imobilizada nas argilas em diferentes tempos de imobilização e relações enzima:suporte.

Amostra Material Tempo Relação enzima:suporte	Rendimento Imobilização (%)	Amostra Material Tempo Relação enzima:suporte	Atividade de Esterificação (U/g)
Poço A Pil. 120 2:0,5	38,23	Poço A 180 2:1	250,56
KSF 60 2:2	34,76	Poço A 120 2:1	233,75
Poço A Pil. 120 2:1	33,87	KSF180 2:2	178,5
Poço A Pil. 180 2:2	33,09	Poço A 60 2:1	157,37
Poço A 120 2:0,5	32,52	Poço A 180 2:0,5	155,84
Poço A Pil. 180 2:0,5	32,38	Poço A Pil. 60 2:2	145,85
KSF 120 2:0,5	30,22	Poço A Pil. 180 2:2	142,92
Poço A 180 2:2	29,74	Poço A Pil. 120 2:2	110,84
KSF 60 2:0,5	27,92	Poço A Pil. 180 2:0,5	107,92
KSF 60 2:1	27,52	Poço A 120 2:0,5	105,42
KSF 180 2:1	26,64	KSF 180 2:0,5	99,69
Poço A Pil. 180 2:1	26,53	Poço A 120 2:2	97,78
Poço A 180 2:1	26,17	Poço A Pil. 180 2:1	90,14
Poço A 120 2:1	23,93	Poço A Pil. 120 2:1	80,98
Poço A 180 2:0,5	22,82	Poço A Pil. 60 2:1	76,40
Poço A Pil. 120 2:2	21,94	Poço A 60 2:2	70,28
Poço A Pil. 60 2:0,5	20,87	KSF 120 2:0,5	68,70
Poço A Pil. 60 2:2	20,47	Poço A 180 2:2	48,89
KSF 120 2:1	20,31	Poço A Pil. 60 2:0,5	48,89
Poço A 120 2:2	19,83	KSF 120 2:1	46,66
Poço A Pil. 60 2:1	18,64	KSF180 2:1	45,93
Poço A 60 2:2	17,62	KSF 60 2:2	41,76
KSF 120 2:2	15,77	Poço A Pil. 120 2:0,5	39,37
Poço A 60 2:1	14,22	KSF 60 2:1	39,37
KSF180 2:2	12,70	Poço A 60 2:0,5	33,62
Poço A 60 2:0,5	11,77	KSF 120 2:2	21,55
KSF180 2:0,5	11,30	KSF 60 2:0,5	13,12

Espectroscopia de Infravermelho

A Figura 26 apresenta os espectros de infravermelho da lipase livre, do suporte Argila Poço A calcinada e pilarizada e da lipase imobilizada neste suporte por 60 minutos e razão mássica enzima:suporte de 2:2.

Na espectroscopia de infravermelho a presença de certas bandas vibracionais está relacionada com a característica de grupos funcionais, auxiliando na identificação qualitativa de determinadas amostras (Tres et al., 2010).

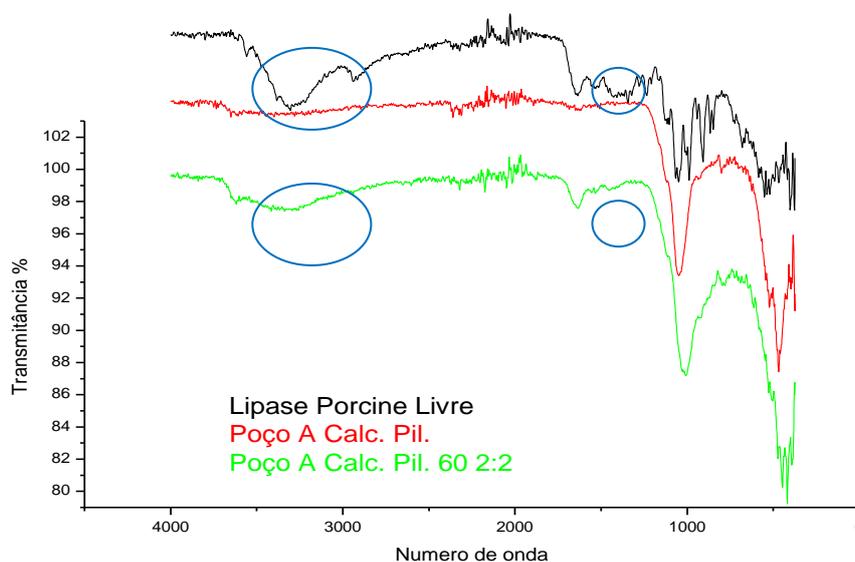


Figura 26. Espectros de infravermelho da lipase livre, do suporte Argila Poço A calcinada e pilarizada e da lipase imobilizada neste suporte por 60 minutos e razão mássica enzima:suporte de 2:2.

A análise do espectro de infravermelho da lipase livre, do suporte e da lipase imobilizada permite verificar a presença de uma banda em 3300cm^{-1} nos espectros da enzima em sua forma livre e imobilizada. Esta banda refere-se a estiramento de grupos (NH) presentes em ligações peptídicas, típicas de enzimas. Observa-se também a presença de uma banda em torno de 1635cm^{-1} de carbonila com menor intensidade em ambos os espectros, caracterizando uma deformação angular simétrica no plano de grupo (NH).

Segundo Silverstein e Webster (2000) todas as amidas primárias mostram uma banda de deformação angular de NH_2 bastante aguda em solução diluída com uma frequência menor do que a banda de $\text{C}=\text{O}$. Esta banda tem de metade a um terço da intensidade da banda $\text{C}=\text{O}$ e quando presente em sólidos em suspensão ou pastilhas essa banda ocorre entre 1660 e 1620cm^{-1} . Desta forma, com a presença das bandas em 3300cm^{-1} e 1635cm^{-1} , tanto no espectro de infravermelho da lipase quanto no suporte imobilizado conclui-se o processo de imobilização demonstrou-se eficiente. A título de ilustração foi apresentado somente o espectro de infravermelho relativo à enzima imobilizada em argila Poço A calcinada e pilarizada. Porém, o comportamento apresentado nesta figura foi também evidenciado nos suportes e na lipase imobilizada em argilas KSF e Poço A.

Análise Textural por Adsorção de N_2 .

A Tabela 27 apresenta a área superficial específica das argilas utilizadas como suporte para imobilização, da lipase livre e das lipases imobilizadas nos diferentes materiais.

Tabela 27. Área superficial específica (BET) para as amostras de argilas (KSF, Poço A natural, Poço A calcinada e pilarizada) e lipase livre e imobilizada.

Amostra	Tempo (min)	Razão mássica enzima:suporte	Área (m^2/g)	Diametro de Poro (Å)
Lipase Livre	-	-	1,06	52,06
Argila KSF	-	-	13,14	38,77
Argila Poço A natural	-	-	58,04	38,60
Argila Poço A calc. pil.	-	-	226,84	38,40
KSF imobilizada	180	2:2	11,35	38,51
Poço A natural	180	2:1	4,10	65,22
Poço A pilarizada	60	2:2	5,87	51,86

Ao comparar as áreas superficiais dos suportes antes e após processo de imobilização da lipase, percebe-se uma diminuição significativa da área nos

suportes contendo a enzima imobilizada, indicando assim a aderência da enzima nas cavidades do suporte e o sucesso de sua imobilização em todos os suportes empregados. Percebe também que ocorreu um aumento no diâmetro de poro das argilas Poço A e Poço A Pilarizada, fato provavelmente devido à entrada da enzima na estrutura de ambas as argilas, ocorrendo uma modificação conformacional destas argilas.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A lipase comercial de pâncreas suíno foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), como apresentado na Figura 27, onde pode-se observar que a enzima em seu estado fundamental (lipase livre) possui uma morfologia variada, partículas de vários tamanhos com uma aparência amorfa e uma estrutura na forma de “fibras” de comprimentos variados.

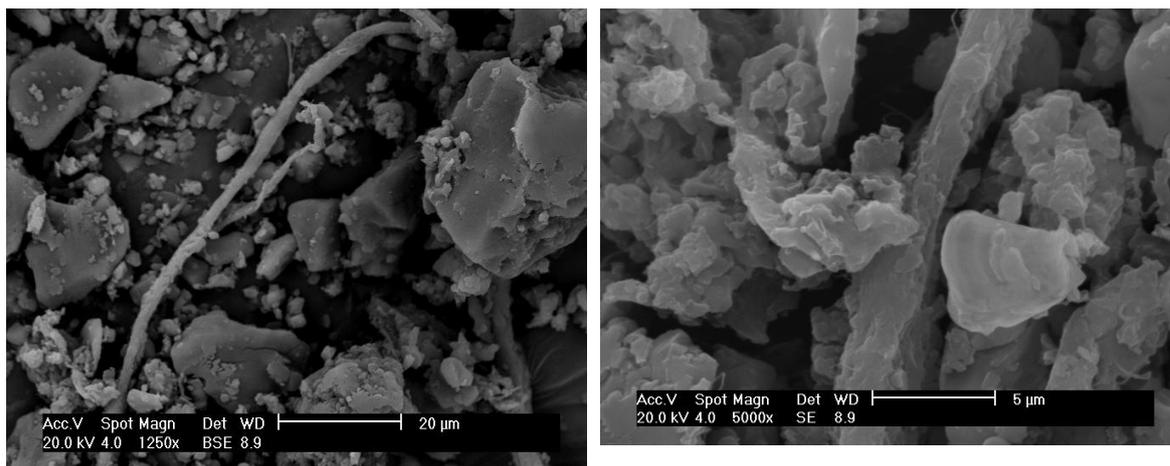


Figura 27. Micrografia da lipase livre de pâncreas suíno.

A Figura 28 apresenta a micrografia da argila KSF. Esta argila possui estrutura lamelar, entretanto sua obtenção ocorre através de um tratamento ácido, no qual ocorre esfoliação da amostra.

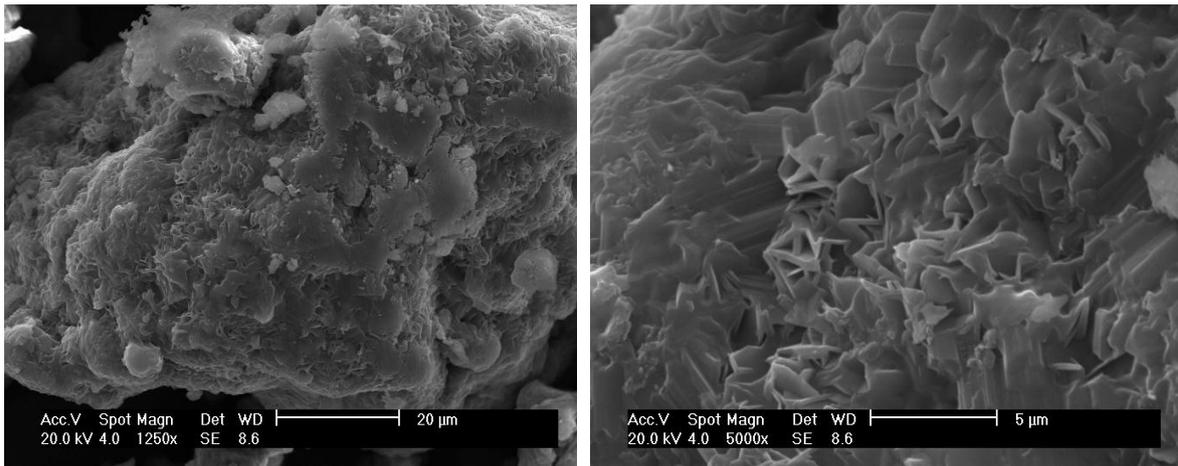


Figura 28. Micrografia da Argila montmorillonita comercial KSF.

Através da análise da Figura 28 pode-se observar agregados em faces e arestas indicando que o material se encontra desorganizado devido ao tratamento ácido, incrementando, desta forma, sua acessibilidade e, conseqüentemente, sua área superficial.

Após o processo de imobilização da lipase comercial de pâncreas suíno na argila KSF (Figura 29), observa-se uma amorfitização da superfície, indicando que a imobilização ocorreu de forma satisfatória, podendo-se observar também a presença de “fibras”, como na micrografia da lipase livre.

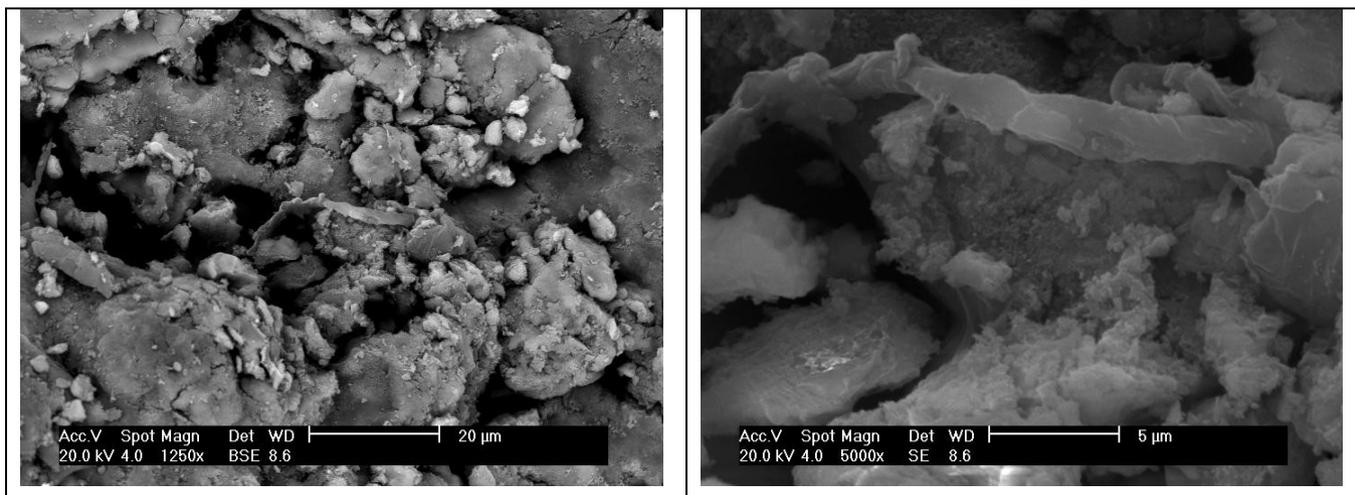


Figura 29. Micrografia da lipase imobilizada em argila montmorillonita comercial KSF, após 180 minutos de imobilização, utilizando razão mássica enzima:suporte de 2:2.

A argila natural Poço A natural apresenta uma morfologia lamelar típica de argilas montmorillonitas, como pode ser observado na Figura 30, sendo o material composto por lamelas de diferentes tamanhos.

Esta argila após processo de imobilização com a enzima no tempo de 180 minutos numa relação de 2g de enzima para 1g de argila (Figura 31) manteve a estrutura lamelar, apresentando lamelas menores, indicando uma certa esfoliação decorrente do processo de imobilização.

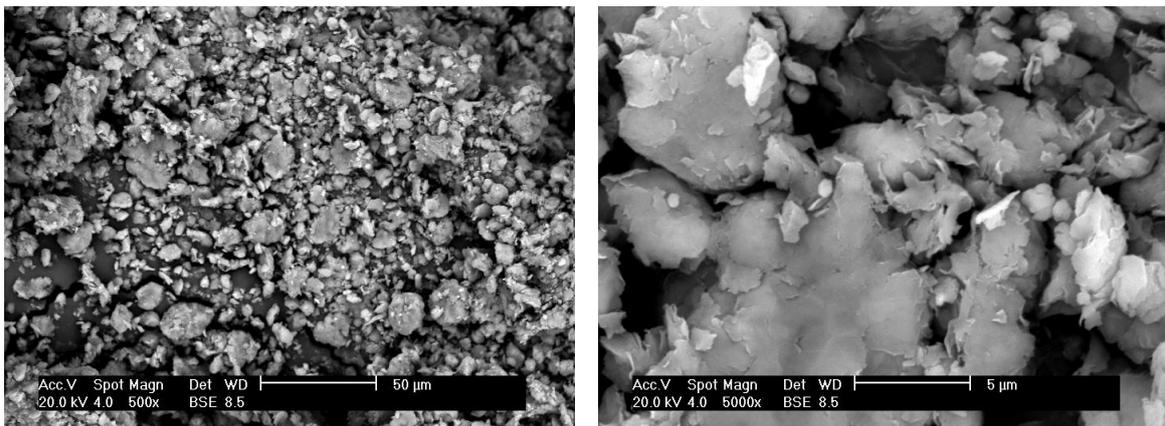


Figura 30. Micrografia da Argila montmorillonita natural Poço A.

Entretanto, em análise comparativa com a micrografia da enzima em sua forma livre, não houve indícios da presença de fibras que apareciam na lipase, indicando, desta forma, que o processo de imobilização ocorreu preferencialmente na superfície interna da argila. Entretanto, podem-se observar alguns aglomerados que podem ser indícios da lipase imobilizada na superfície externa da argila.

A Figura 32 apresenta a micrografia da argila natural Poço A após o processo de pilarização e calcinação onde observa-se que a morfologia lamelar foi mantida, em concordância com os resultados de difração de raios X e área superficial, que indicam que o processo de pilarização ocorreu.

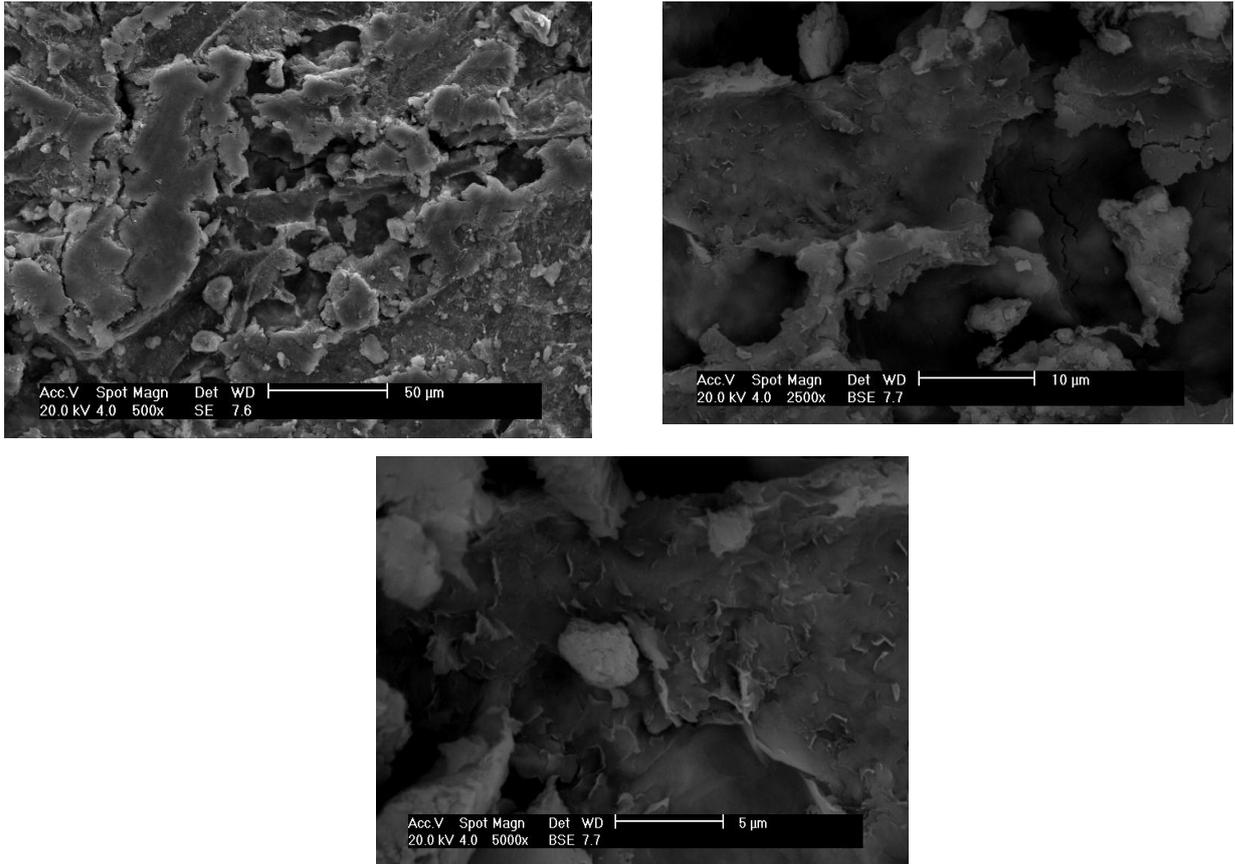


Figura 31. Micrografia da lipase imobilizada em argila montmorillonita natural Poço A após 180 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:1.

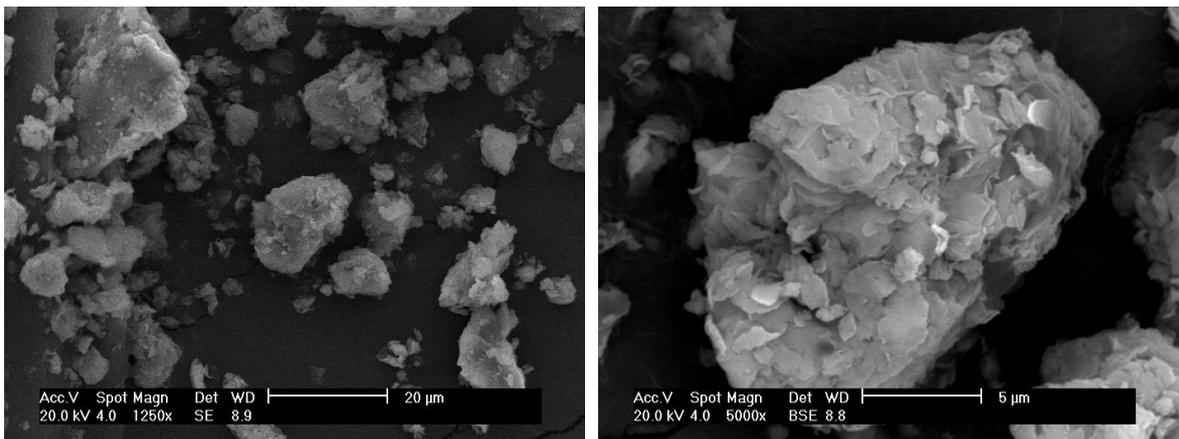
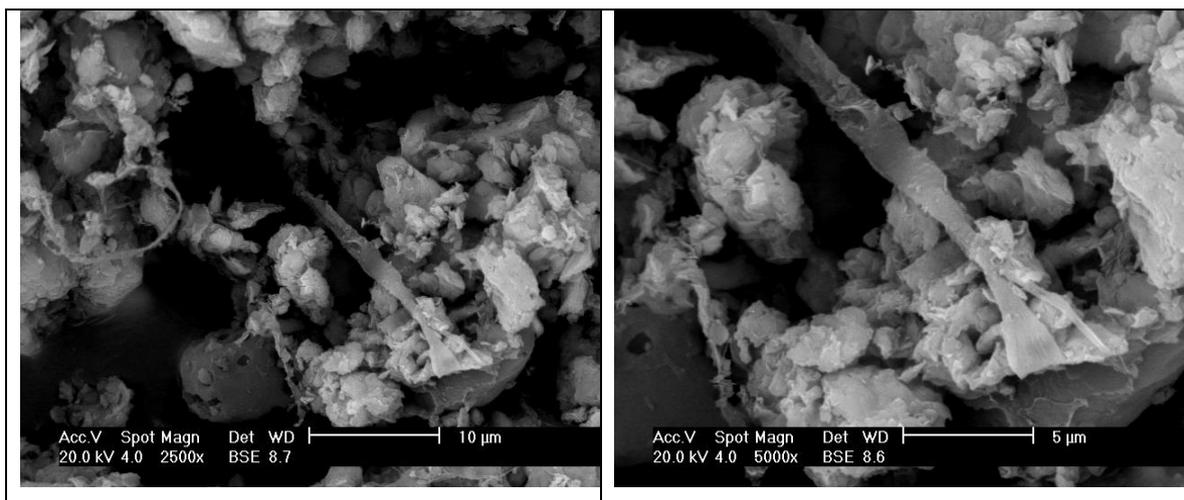


Figura 32. Micrografia da argila montmorillonita Poço A calcinada e pilarizada.

Esta argila pilarizada e calcinada foi também submetida ao processo de imobilização da enzima comercial de pâncreas suíno. A análise das micrografias

antes e após o processo de imobilização permitiu verificar uma modificação na morfologia do material. Ao comparar ambas as micrografias (Figura 32 e Figura 33), percebe-se o aparecimento também das “fibras” e partículas amorfas como havia sido evidenciado na micrografia da enzima livre, indicando, desta forma, que a lipase foi imobilizada com sucesso na argila pilarizada.



.Figura 33. Micrografia da lipase Imobilizada em argila montmorillonita Poço A calcinada e pilarizada, após 60 minutos de imobilização, utilizando razão mássica enzima:suporte de 2:2.

Difração de Raio-X

A Figura 34 apresenta os difratogramas de Raio-X da lipase livre, da argila montmorillonita KSF comercial e da lipase imobilizada neste suporte após 180 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:2. Observa-se que a estrutura da argila KSF se mantém após a imobilização, indicando que a incorporação da lipase ocorreu sem modificar a estrutura da argila. Não se observam picos referentes à enzima livre, indicando que a mesma ficou imobilizada na argila e não se encontra numa mistura física com a argila.

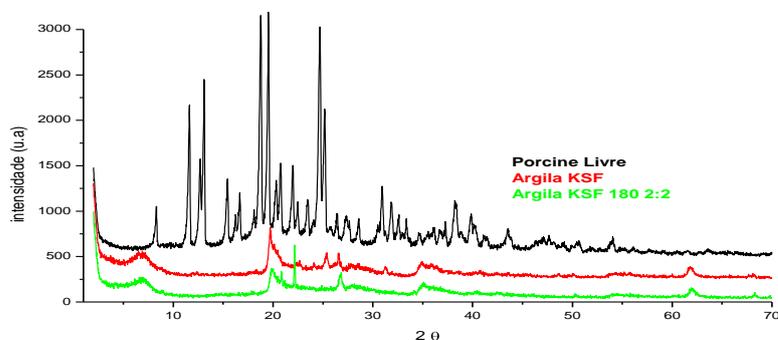


Figura 34. Difratoogramas de Raios-X da lipase livre, da argila montmorillonita KSF comercial e da lipase imobilizada em argila montmorillonita comercial KSF após 180 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:2.

A Figura 35 apresenta os difratogramas de Raio-X da lipase livre, da argila Poço A natural e da lipase imobilizada neste suporte após 180 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:1. Observa-se que após o processo de imobilização da enzima na argila natural ocorre um deslocamento do pico 001 para ângulos menores, indicando que a enzima está na região interlamelar da argila e provoca a expansão das lâminas e, conseqüentemente, um aumento do espaçamento basal. Na argila, após o processo de imobilização, não se observam picos referentes à enzima, indicando que a mesma se encontra na região interlamelar e não como uma mistura física com a argila.

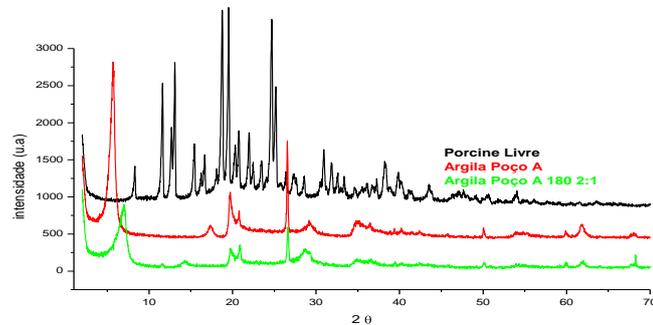


Figura 35. Difratomogramas de Raios-X da lipase livre, argila montmorillonita Poço A natural e lipase imobilizada em argila montmorillonita natural Poço A após 180 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:1.

A Figura 36 apresenta os difratogramas de Raio-X da lipase livre, da argila montmorillonita Poço A comercial pilarizada e da lipase imobilizada neste suporte após 60 minutos de imobilização e razão enzima:suporte de 2:2.

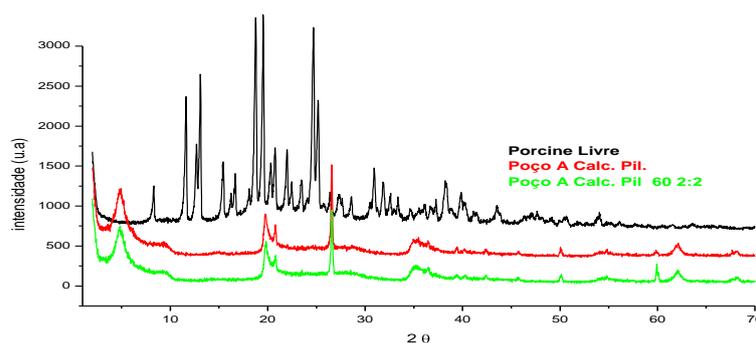


Figura 36. Difratomogramas de Raios-X da lipase livre, argila montmorillonita Poço A calcinada e pilarizada e lipase imobilizada em argila montmorillonita Poço A calcinada e pilarizada após 60 minutos de imobilização e razão mássica enzima:suporte de 2:2.

No caso da argila pilarizada, não se observa o deslocamento do primeiro pico (001) pois a estrutura se encontra pilarizada, o espaçamento interlamelar encontra-se fixo pela inserção dos pilares. A argila não pode ser expandida. Entretanto, observa-se que a enzima encontra-se na região interlamelar, uma vez que não se observam picos referentes à enzima livre. Na argila KSF não ocorre deslocamento no pico 001, por que o mesmo é pouco intenso e este material encontra-se desorganizado, a imobilização ocorre na região interlamelar mas mantém o material desorganizado, por isso não ocorre a expansão da argila e conseqüente deslocamento do pico 001.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Após a realização do estudo de imobilização da lipase de pâncreas suíno em 25 diferentes suportes inorgânicos, pode-se concluir que:

- A caracterização parcial dos suportes mostrou diferenças significativas entre eles em termos de área superficial, diâmetro de poros e morfologia;
- As características do suporte influenciaram fortemente a quantidade de enzima adsorvida, os rendimentos de imobilização e a atividade de esterificação da enzima imobilizada.

- Na etapa de *screening* de suportes:
 - As argilas KSF, Poço A e Poço A pilarizada apresentaram potencial para utilização como agentes imobilizantes da lipase de pâncreas de porco, em termos de rendimento de imobilização e atividade de esterificação da enzima imobilizada;
 - Rendimentos de imobilização de 76,32 e 52,01% foram obtidos para as enzimas imobilizadas na Argila KSF e Argila Poço A, respectivamente;
 - Atividades de esterificação de 154,61 e 129,13U/g foram obtidos para as enzimas imobilizadas em Argila Poço A pilarizada e Argila Poço A, respectivamente.

- Na etapa de otimização do processo de imobilização nos três suportes pré-selecionados no *screening*:
 - Rendimentos de imobilização de 38,23% foram obtidos utilizando a argila Poço A pilarizada como suporte, após 120 minutos de imobilização e relação mássica enzima:suporte de 2:0,5;
 - Atividades de esterificação de 250,56U/g foram obtidas utilizando a argila Poço A como suporte, após 180 minutos de imobilização e relação mássica enzima:suporte de 2:1.

- Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para o desenvolvimento de processos de imobilização de lipases utilizando suportes de baixo custo.

De forma geral, pode-se concluir que a estrutura dos suportes influi significativamente no processo de imobilização de enzimas e, conseqüentemente, em suas atividades catalíticas. A área superficial, tamanho de poros e composição química são parâmetros importantes neste processo de imobilização.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após a análise dos resultados obtidos no decorrer deste trabalho, pode-se sugerir como trabalhos futuros:

- Otimizar o processo de imobilização utilizando outros suportes apontados como de interesse na etapa de *screening*;
- Avaliar o tratamento prévio dos suportes antes do processo de imobilização;
- Avaliar a estabilidade da enzima imobilizada nos diferentes suportes frente ao armazenamento em baixas temperaturas;
- Caracterizar parcialmente as lipases imobilizadas nos três suportes apontados como potenciais (Argila KSF, Poço A e Poço A pilarizada) em termos de temperatura e pH ótimos; temperatura e pH de estabilidade e especificidade frente a vários substratos (ácidos graxos e alcoóis);
- Confrontar os dados de caracterização parcial das enzimas imobilizadas nos diferentes suportes com os da enzima na forma livre;
- Imobilizar enzimas não comerciais, seguindo a metodologia definida neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas H., Hiol A., Deyris V., Comeau L.; Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002; 31: 968-975.

Abdullah, A. Z., Sulaiman, N. S., Kamaruddin, A. H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 44: 263-270.

Bagi, K., Simon, L. M., Szajáni, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997; 20: 531-535.

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

Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L. Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado, Rio de Janeiro; 2008, cap 6.

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

Brígida A.I.S., Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra da casca de coco verde como suporte. Fortaleza: 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará.

Bryjak Jolanta, Trochimczuk Andrzej W. Immobilization of lipase and penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 39: 573-578.

Cabral, P. P., Fonseca, M.M.R., Dias, S. F. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. *Biochemical Engineering Journal*. 2010; 48: 246-252.

Cardias, H. C. T.; Grininger, C. C.; Trevisan, H. C.; Guisan, J. M.; Giordano, R. L. C. Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin g acylase on macroporous sílica. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 1999; 16: 141-148.

Castilho, R. L., Freire, M. G. D. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. *Revista Brasileira de Farmácia*. 2000; 81: 48-56.

Castro, H. F.; Anderson, W. A. Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases. *Química Nova*. 1995; 18: 544-554.

Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Aguiar, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*. 2004; 27: 16-21.

Chang, S., Chang, S., Yen, Y. H., Shied, C. J. Optimum immobilization of *Candida rugosa lipase* on Celite by RSM. *Applied Clay Science*. 2007; 37: 67-73.

Chang, Y. K., Chu, L. A simple method for cel disruption by immobilization of lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. *Biochemical Engineering Journal*. 2007; 35: 37-47.

Charles, W. Garner, Jr., and Louis C. Smith. - Porcine Pancreatic Lipase: A glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1972; 247: 561-565.

Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Delorme, P., Willemot, R.M. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS Letters*. 1990; 276: 181-184.

Corma. A., García, H., Miralles, J. High activity of layered zeolite ITQ-2 as catalyst for the hydroxyalkylation of 2-methoxynaphalene and naphthalene with paraformaldehyde. Comparison of its performance with that of conventional zeolites or mesoporous Al/MCM-41. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2001; 43: 161-169.

Cseri, T., Békássy, S., Figueras, F., Cseke, E., Menorval, L.C., Dutartre, R. Characterization of clay-based K catalysts and their application in Friedel-Crafts alkylation of aromatics. *Applied Catalysis A: General*. 1995; 132:141-155.

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

Dave, R., Madamwar, D. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid. *Process Biochemistry*. 2006; 41: 951-955.

Detoni, C., Pergher, S. B. C. Estudo da Influência do template no processo de cristalização das zeólitas MCM-22 e ZSM-5. *Vivencias*. 2006; 1: 74-90.

Dizge N, Keskinler B, Tanriseven A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*. 2009; 44: 220–225.

Draget K. I., Skjak-Braek G., Smidsrod O., Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1997; 21:47-55.

Du W, Xu Y, Liu D, Zeng J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2004; 30: 125–129.

Dumitriu, E.; Secundo, F.; Patarin, J.; Fechete I. Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2003; 22: 119-133.

Dutra J.C.V., Terzi S.C., Bevilaqua J.V., Damaso M.C.T., Couri S., Langone M.A.P., Senna L.F.; Lipase Production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008; 147:63-75.

Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th ed., Springer – Verlag: New York, 2000.

Fan, W., Gao, L., Dong, J. Preparation of zeolite ZSM-35 disc by hydrothermal transformation of sintered body. *Materials Letters*. 2006; 60: 386-388.

Freitas L, Da Rós PCM, Santos JC, de Castro HF. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interesterification of babassu oil (*Orbinya sp.*). *Process. Biochemistry*. 2009; 44:1068–1074.

Frontera, D., Macario, A., Katovic, A., Crea, F., Giordano, G. Direct synthesis of zeolites self-bonded pellets for biocatalyst immobilization. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 2005; 158: 383-390.

Fuentes, I. E., Viseras, C. A., Ubiali, D., Terreni, M., Alcantara, A. R. Different phyllosilicates as supports for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. 2001; 11: 657–663.

Gandhi, N. N., Vijayalakshmi, V., Sawant, S. B., Joshi, J. B. Immobilization of *Mucor miehei* lipase on ion exchange resins. *The Chemical Engineering Journal*. 1996; 61: 149-156.

Garner, C. W., Smith, L. C. Porcine Pancreatic Lipase: A glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1972; 247: 561-565.

Giannetto, G. P., Rendón , A. M., Fuentes, G. R; Zeólitas: Características, Propriedades y Aplicaciones; Facultad de Ingenieria, UCV; p.23, 2000.

Girelli, A.M.; Mattei, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal Chromatography B*. 2005; 819: 3-16.

Gitlesen T., Bauer M., Adlercreutz P.; Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997; 1345:188-196.

Gomes, F. M.; Paula, A. V.; Silva, G. S.; Castro, H. F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildimidazol. *Química Nova*. 2006; 29: 710-718.

Gonçalves, A. P. V., Lopes, J. M., Lemos, F., Ribeiro, F. R., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R. Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani* pisi. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997; 20: 93-101.

Gopinath, S., Sugunan, S. Enzymes immobilized on montmorillonite K-10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Applied Clay Science*. 2007; 35: 67-75.

Gupta M.N., Roy I.; Enzyme in organic media: Forms, functions and applications. *European Journal of Biochemistry*. 2004; 271: 2575-2583.

Haki, G. D., Rakshit, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 2003; 89: 17-34.

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

Hernández-Jústiz, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Terreni, M.; Guisan, J.M. Use of aqueous two-phase systems for in situ extraction of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998; 59: 73-79.

Huang, J., Liu, Y., Wang, X. Silanized palygorskite for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 57: 10–15.

Illanes, A. Enzyme Biocatalysis – Principles and Applications. New York: Springer, 2008.

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

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

Jesus, P. C.; João, J. J.; Silva, P. I. F.; Burlin, G.; Nascimento, M. G. Organogel: um Novo Sistema para a Imobilização de Lipases e sua Aplicação em Síntese Orgânica. *Química Nova*. 1997; 20: 664-672.

Kaewthong, W., Sirisansaneeyakul, S., Prasertsan, P., H-Kittikun, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochemistry*. 2005; 40: 1525-1530.

Kartal, F., Akkaya, A., Kilinc, A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted poly vinyl alcohol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 57: 55-61.

Kemeny D.M., Challacombe S.J.; In: Elisa and other solid phase immunoassays. New York, John Wiley & Sons Ltda, 1988.

Kim, H.J.; Youn, S.H.; Shin, C.S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. *Journal of Biotechnology*. 2006; 123:174-184.

Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002; 13: 345-351.

Kloprogge, J. T., Komarneni, S., Amonette, J. E. Synthesis of smectite clay minerals; a critical review. *Clays and Clay Minerals*. 1999; 47: 529-554.

Knezevic, Z., Bobic, S., Milutinovic, A., Obradovic, B., Mojovic, L., Bugarski, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. *Process Biochemistry*. 2002; 38: 313-318.

Knezevic, Z., Mojovic, L., Adnadjevic, B. Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998; 22: 275-280.

Krieger N., Taipa M.A., Melo E.H.M., Lima J.L., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S.; Purification of *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. *Bioprocess Engineering*, 2004; 20: 59-65.

Kumari V, Shah S, Gupta MN. Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. *Energy and Fuels* 2007; 21: 368–372.

Li, Y., Zhou, G., Li, C., Qin, D., Qiao, W., Chu, B. Adsorption and catalytic activity of porcine pancreatic lipase on Rod-like SBA-15 mesoporous material. *Colloids and Surfaces. Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009; 341: 79-85.

Li, Y., Zhou, G., Qiao, W., Wang Y. Immobilization of porcine pancreas lipase on fiber-like SBA-15 mesoporous material. *Materials Science and Engineering. B*. 2009; 162: 120-126.

Liu, C-H., Lu, W-B., Chang, J-S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. *Process Biochemistry*, 2006; 41: 1940-1944.

Lu J, Chen Y, Wang F, Tan T. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 56:122–125.

Lu J, Deng L, Zhao R, Zhang R, Wang F, Tan T. Pretreatment of immobilized *Candida* sp. 99–125 lipase to improve its methanol tolerance for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010; 62:15–18.

Lu J, Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99–125. *Process Biochemistry*. 2007; 42:1367–1370.

Lu J, Nie K, Wang F, Tan T. Immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 catalyzed methanolysis of glycerol trioleate: Solvent effect. *Bioresource Technology*. 2008; 99:6070–6074.

Lv P, Wang X, Yuan Z, Tan T. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida* lipase on textile cloth. *Energy Source Part A*. 2008; 30: 872–879.

Macario, A., Katovic, A., Giordano, G., Forni, L., Carloni, F., Filippini, A., Setti, L. Immobilization of Lipase on microporous and mesoporous materials: studies of the support surfaces. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 2005; 155: 381-394.

Macario, A., Moliner, M., Diaz, U., Jorba, J. L., Corma, A., Giordano, G. Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related materials. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 2008; 174: 1011-1016.

Macario, A.; Calabrò, V., Curcio, S., M. De Paola, Giordano, G., Iorio, G., Katovic, A. Preparation of mesoporous materials as a support for the immobilization of lipase. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 2002; 142: 1561-1568.

Martinez, J.G., Pariente, J.P., *Materiales Zeolíticos: Síntesis, Propiedades y Aplicaciones*; Publicaciones Univesidad de Alecante; p. 13, 2002.

Masih, D., Kobayashi, T., Baba, T. Hydrothermal synthesis of pure ZSM-22 under mild conditions. *Chemical Communications*. 2007; 3303-3305.

Melo, A. Farias.; Saavedra, G. A.; Gonçalves, L. R. B.; Ferreira, A. L. O. Imobilização de tanase em suportes vítreos utilizando γ -aminopropiltrióxido. *Comunicado Técnico* 109, 2005; 1ª edição ISSN 1679-6535.

Menoncin, S.; Domingues, N. M.; Freire, D. M. G.; Oliveira, J. V.; Di Luccio, M.; Treichel, H.; Oliveira, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Ciência Tecnologia de Alimentos*. 2009; 29: 440-443.

Meunier SM, Legge R.L. Evaluation of diatomaceous earth as a support for sol-gel immobilized lipase for transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010; 62:53–58.

Mignoni, M. L., Detoni, C., Pergher, S. B. C. Estudo da síntese da zeólita ZSM-5 a partir de argilas naturais. *Química Nova*. 2007; 30: 45-48.

Mignoni, M., Nascimento Filho, I. Pergher, S. B. C. Avaliação preliminar da aplicabilidade da zeólita NaX para a retenção seletiva de compostos nitrogenados em amostras de efluente de frigorífico. *Perspectiva*. 2006; 30: 7-13.

Nakanishi K., Sakiyama T., Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002; 91: 232-244.

Ncube, I., Read, J. S. Evaluation of *Vernonia galamensis* lipase (acetone powder) for use in biotechnology. *Crops and Products*. 1995; 3: 285-292.

Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2006; 43:142–147.

Noureddini H, Gao X, Philkana RS. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*. 2005; 96: 769–777.

Oliveira, A. C, Rosa, M. F., Barros, M. R. A., Cabral, J. M. S. Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid — a kinetic. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2001; 11: 999–1005.

Oliveira, P. C.; Alves, G. M.; Castro, H. F. Síntese de butirato de butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. *Química Nova*. 2000; 23: 632-636.

Orive G., Ponce R.M., Hernández A.R., Gascón M., Pedraz I.J.L.. Biocompatibility of microcapsules for cells immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*. 2002; .23:3825-3831.

Padmini, P., Rakshit, S. K., Baradarajan, B. Studies on immobilization of lipase on alumina for hydrolysis of rice bran oil. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 1993; 9: 43-46.

Paiva, A.L.; Balcão, V.M.; Malcata, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by imommbilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000; 27: 187-204.

Paques, F. W.; Macedo, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*. 2006; 29:93-99.

Pergher, S. B. C., Corma, A., Fornes, V. Evaluación de la Estructura Porosa de los Materiales MCM-22, MCM-36 e ITQ-2. *Química Nova*. 2003; 26: 828-831.

Pergher, S. B. C., Corma, A., Fornes, V. Preparacion y Caracterizacion de lá Zeólita MCM-22 y de su precursor laminar. *Química Nova*. 2003; 26: 795-802.

Pergher, S. B. C., Oliveira, L. C. A., Smaniotto, A., Petkowicz, D. I. Materiais magnéticos baseados em diferentes zeólitas para remoção de metais em água. *Química Nova*. 2005; 28: 751-755.

Pinheiro, A. D. T.; Brígida, A. I. S.; Gonçalves, L. R. B. Influência do pH no processo de imobilização de lipase em Fibra da casca de coco verde. *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – (VI COBEQ) UNICAMP 2001*.

Powell L.W.; In: *Microbial Enzyme and Biotechnology*, London, Elsevier Science Publishers, 1990.

Qi W-T., Ma J., Yu W-T., Xie Y-B., Wang W., Ma X.; Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38: 697-704.

Rahman, M. B. A., Tajudin, S. Md., Hussein, M. Z., Salleh, A. B., Basri, M. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. *Applied Clay Science*. 2005; 29: 111-116.

Reetz M.T., Zonta A., Simpelkamp J.; Efficient immobilization of lipase by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnology. Bioengineering*. 1996; 49:194-199.

Rigo, R. T., Pergher, S. B. C., Petkowicz, D. I. Um novo procedimento de síntese da zeólita A empregando argilas naturais. *Química Nova*. 2009; 32: 21-25.

Rocha W. S., Grosso C.R.F.; Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose. *Sitientibus*. 2006; 35:125-148.

Rodrigues M.S.M.; Produção de lipases e sua aplicação na eliminação de resinas em lignocelulósicos. Campinas: 1997. Tese de Doutorado Departamento de Química Orgânica. Universidade Estadual de Campinas.

Rossetto, E., Beraldin, R., Penha, F. G., Pergher, S. B. C. Caracterização de argilas bentonitas e diatomitas e sua aplicação como adsorventes. *Química Nova*. 2009;.32: 2064-2067.

Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*. 2005;.119: 291–299.

Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V. Comparison among immobilized lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2008; 54:19–26.

Sanjay, G., Sugunan, S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chemistry*. 2006; 94: 573-579.

Sebrão, D.; Silva, V. D.; Nascimento, M. G.; Moreira, M. A. Imobilização de Lipases em filme de caseinato de sódio/Glicerol: Aplicação na síntese de ésteres. *Química Nova*, 2007; 30: 1182-1187.

Serralha, F. N., Lopes, J. M., Lemos, F., Ribeiro, R., Prazeres, D. M. F., Aires-Barros, M. R., Cabral, J. M. S. Application of factorial design to the study of an alcoholysis transformation promoted by cutinase immobilized on NaY zeolite and Accurel PA6. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004; 27: 19-27.

Shah S, Gupta MN. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. *Process. Biochemistry*. 2007; 42:409–414.

Shah S, Sharma S, Gupta MN. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy and. Fuels*. 2004; 18:154–159.

Sharma R, Chisti Y, Banerjee U C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 2001; 19:627-662.

Shieh C. J, Liao HF, Lee CC. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2003; 88:103–106.

Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, Sugihara A, Noda H, Fukuda H. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal American Oil Chemical Society*. 1999;76:789–793.

Silva C.H., Puls J., Souza M.V., Ferreira Filho E.X.; Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures *Aspergillus fumigates fresenius*. *Revista de Microbiologia*. 2001; 28:152-156.

Silverstein, R. M., Webster, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 2000; Pg.93-94. 6ª Edição.

Soumanou MM, Bornscheuer UT. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003; 33:97-103.

Spagna, G., Pifferi, P. G., Gilioli, E. Immobilization of a pectinlyase from *Aspergillus niger* for application in food technology. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995; 17: 729-738.

Sun S.Y., Xu Y.; Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*. 2008; 43:219-224.

Tan T, Nie K, Wang F. Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. lipase at high water content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006; 128:109–116.

Tavolaro, A., Tavolaro, P., Drioli, E. Zeolite inorganic supports for BSA immobilization: Comparative study of several zeolite crystals and composite membranes. *Colloids and Surfaces B*. 2007; 55: 67-76.

Tianwei Tan, Jike Lu, Kaili Nie, Li Deng, Fang Wang. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, 2010; 28: 628-634.

Tischer, W.; Kasche, V. Immobilized enzymes: crystal or carriers? *Trends in Biotechnology*, 1999; 17: 326-335.

Treichel H., Oliveira D., Mazutti M.A., Di Luccio M., Oliveira V.J.; A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 2010: DOI 10.1007/s11947-009-0202-2.

Tres, M. V., Ferraz, H. C., Dallago, R. M., Di Luccio, M., Oliveira, J. V. Characterization of polymeric membranes used in vegetable oil/organic solvents separation. *Journal of Membrane Science*. 2010; 362: 495 – 500.

Tzialla, A. A., Pavlidis, I. V., Felicissimo, M. P., Rudolf, P., Gournis, D., Stamatis, H. Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of α -pinene. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 1587-1594.

Vermuë M.H., Tramper J.; Biocatalysis in non-conventional media: medium engineering aspects. *Pure & Applied Chemistry*. 1995; 67: 345-373.

Vidinha, P., Augusto, V., Almeida, M., Fonseca, I., Fidalgo, A., Ilharco, L., Cabral, J. M. S., Barreiros, S. Sol-gel encapsulation: Na efficient and versatile immobilization technique for cutinase in non-aqueous media. *Journal of Biotechnology*. 2006; 121: 23-33.

Villeneuve, P., Muderhwa, J. M.; Graille, J.; Haas, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000; 9: 113-148.

Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; *Fundamentos de Bioquímica*, Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, cap 4.

Wang J-X, Huang Q-D, Huang F-H, Wang J-W, Huang Q-J. Lipase-catalyzed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant. *Chinese Journal of Biotechnology*. 2007; 23:1121–1128.

Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, Tominaga Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of American. Oil Chemical. Society*. 2000; 77:355–360.

Yagiz, F., Kazan, D., Akin, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. *Chemical Engineering Journal*. 2007; 134: 262-267.

Yang, G., Tian-Wei, T., Kai-Li, N., Fang, W. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. *Chinese Journal of Biotechnology*. 2006; 22: 114 -118.

Yesiloglu Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. *Journal of American Oil Chemical Society*. 2004;.81:157–160.

Yesiloglu, Yesim. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry*. 2005; 40: 2155-2159.

Yin, C.; Liu, T.; Tan, T. Synthesis of vitamin A esters by immobilized *Candida* sp. lipase in organic media. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2006; 14:81-86.

Yiu, H. H. P, Wright, P. A., Botting, N. P. Enzyme immobilization using siliceous mesoporous molecular sieves. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2001; 44: 763-768.

Zaidan, U. H., Rahman, M. B. A., Barsi, M., Othman, S. S., Salleh, A. B. Silylation of mica for lipase immobilization as biocatalysts in esterification. *Applied Clay Science*. 2010; 47: 276-282.

Zaks, A.; Klibanov, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry*. 1988; 263: 8017- 8021.

Zamora, P. P., Pereira, C. M., Tiburtius, E. R. L., Moraes, S. G., Rosa, M. S Minussi, R. C., Durán, N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2003; 42: 131–144.

Zeng, H. Y., Liao, K., Deng, X., Jiang, H., Zhang, F. Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel. *Process Biochemistry*. 2009; 44: 791-798.