

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
CAMPUS POÇOS DE CALDAS

MATHEUS MOREIRA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE
IMOBILIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DAS
PROPRIEDADES CATALÍTICAS E DETERMINAÇÃO DOS
PARÂMETROS TERMODINÂMICOS PARA A LIPASE
PRODUZIDA POR *Geotrichum candidum*, VISANDO SEU
EMPREGO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS
CONCENTRADOS**

Poços de Caldas/MG
2017

MATHEUS MOREIRA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE
IMOBILIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DAS
PROPRIEDADES CATALÍTICAS E DETERMINAÇÃO DOS
PARÂMETROS TERMODINÂMICOS PARA A LIPASE
PRODUZIDA POR *Geotrichum candidum*, VISANDO SEU
EMPREGO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS
CONCENTRADOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas - *Campus* Poços de Caldas.

Orientadora: Daniela Battaglia Hirata.

Co-orientador: Rodrigo Corrêa Basso.

Poços de Caldas/MG

2017

F383a Ferreira, Matheus Moreira.

Avaliação de diferentes estratégias de imobilização, caracterização das propriedades catalíticas e determinação dos parâmetros termodinâmicos para a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, visando seu emprego na produção de ácidos graxos concentrados / Matheus Moreira Ferreira. – Poços de Caldas, 2017.

95 f. –

Orientadora: Daniela Battaglia Hirata.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.
Bibliografia.

1. Engenharia Química. 2. Lipase. 3. Imobilização. 4. Hidrólise. 5. Algodão. I. Hirata, Daniela Battaglia. II. Título.

CDD: 660

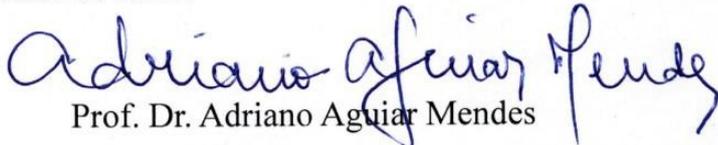
MATHEUS MOREIRA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE IMOBILIZAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES CATALÍTICAS E
DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS PARA A
LIPASE PRODUZIDA POR *Geotrichum candidum*, VISANDO SEU
EMPREGO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS CONCENTRADOS**

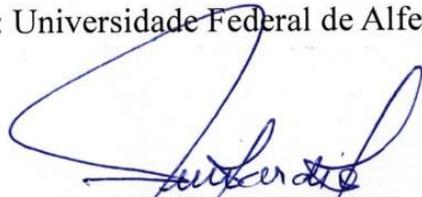
A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 09 de junho de 2017.


Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

Instituição: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar



Prof(a.) Dr(a). Daniela Battaglia Hirata

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Dedico a Deus por ser essencial em minha vida, à Flaviane, à minha família e aos meus amigos pelo imenso apoio durante esta caminhada e por estarem comigo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por me ensinarem o valor e a importância do estudo e pela instrução que me deram para a vida.

À Prof^a Dr (a.) Daniela Battaglia Hirata, orientadora, pela dedicação, paciência, conhecimentos transmitidos, por todo incentivo na realização deste trabalho e na minha formação como uma pessoa melhor.

Aos amigos e companheiros de trabalho Gustavo A. Silveira e Fernanda Luzia Borba Santiago pelas conversas, conhecimentos compartilhados e tempo destinado a realização deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e à Universidade Federal de Alfenas pelo incentivo à pesquisa e à formação acadêmica.

Ao Co-Orientador Dr. Rodrigo Corrêa Basso pelo apoio na realização deste estudo.

Ao Prof^o Dr. Adriano Aguiar Mendes pelo apoio e contribuições a este trabalho.

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram na concretização deste trabalho. O meu agradecimento!

RESUMO

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) são importantes biocatalisadores devido à sua afinidade por vários substratos e à sua quimio, régio e enantiosseletividade. Elas atuam na hidrólise de triacilgliceróis para produção de ácidos graxos livres e na reação inversa (esterificação) em meios não aquosos. Uma lipase produzida por *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) possui seletividade para a hidrólise das ligações ésteres de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como os ácidos oleico e linoleico, presentes em diversos triacilgliceróis. Esse tipo de seletividade permite que essas ligações sejam rapidamente hidrolisadas aumentando a velocidade e conseqüentemente a eficiência do processo de hidrólise de óleos vegetais. Entretanto, o alto custo das enzimas ainda é um fator limitante para sua ampla utilização. A imobilização, em suportes sólidos, pode ser uma alternativa para viabilizar o emprego das enzimas em processos industriais, permitindo seu reuso e ainda melhorando sua estabilidade e/ou seletividade. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou diferentes estratégias de imobilização, bem como a caracterização das propriedades catalíticas e a determinação dos parâmetros termodinâmicos da lipase produzida por *G. candidum* (LGC) via fermentação submersa, para a produção de ácidos graxos concentrados pela hidrólise de diferentes óleos vegetais (oliva, algodão e palmiste). Ensaio preliminares de imobilização da LGC em suportes hidrofóbicos (octil-agarose e octil-sílica) mostraram que estes não foram capazes de realizar a purificação da enzima do caldo de fermentação tão eficientemente quanto polihidroxibutirato (PHB) via imobilização, devido às diversas impurezas presentes no caldo de fermentação. Assim, a LGC bruta foi purificada via precipitação por solvente orgânico para melhor analisar a imobilização em diferentes tipos de suporte e por distintos métodos de imobilização, como a adsorção física e a iônica e a ligação covalente multipontual. Dentre estes métodos, a máxima atividade hidrolítica ($45,4 \pm 0,2$ U/ g de biocatalisador) e a maior porcentagem de atividade recuperada (22,8 %) foram observadas para a imobilização de LGC por adsorção iônica em MANAE-agarose. Foram avaliadas as propriedades catalíticas da LGC purificada e imobilizada em MANAE-agarose, observando uma maior estabilidade da lipase em uma ampla faixa de pH e maior estabilidade térmica quando comparado com a enzima livre. A imobilização da LGC em MANAE-agarose também reduziu em 50% a energia de ativação (E_a) e aumentou a quantidade de produto formado em reações de hidrólise, verificado através do cálculo dos parâmetros cinéticos como a velocidade de reação máxima ($v_{m\acute{a}x}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_m). A hidrólise do óleo de oliva pela LGC imobilizada em MANAE-agarose sem a adição de emulsificantes atingiu 100% de hidrólise em 120 minutos de reação, sendo superior a enzima livre (95,5% em 140 min). No entanto, na reutilização do biocatalisador observou-se uma redução de 50% na reação de hidrólise para o segundo ciclo e de 5,5% para o terceiro ciclo. Os resultados obtidos na hidrólise dos óleos de algodão e de palmiste mostraram que a LGC livre expressa sua máxima atividade hidrolítica em pH 8,0 e temperatura de 37 °C, para ambos os substratos empregados. Entretanto, uma maior atividade foi observada para o óleo de algodão, devido à quantidade de ácidos graxos insaturados presentes em sua composição (\approx 71%) comparando-se com o óleo de palmiste (\approx 19%).

Palavras-chave: Lipase. *Geotrichum candidum*. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Imobilização. Hidrólise. Algodão. Palmiste.

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolases E.C. 3.1.1.3) are important biocatalysts, due to their catalytic activity towards several substrates and their chemical, regio as well as stereo selectivity. They acts in the hydrolysis of triacylglycerols in order to produce free fatty acids, and in the inverse reaction (esterification) in non-aqueous mediums. Some lipases produced by *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) possess selectivity with the hydrolysis of the long-chain unsaturated fatty acid ester bonds, like oleic and linoleic acids that are present in several triacylglycerols. This type of selectivity allows these bonds to be rapidly hydrolyzed, increasing the speed and consequently the efficiency of the vegetable oils hydrolysis. However, the high cost of enzymes is still a limiting factor for their widespread use. Immobilization on solid supports can be a viable alternative to the use of enzymes in industrial processes, allowing its reuse and to improve their stability and/or selectivity. In this context, the present work allowed the evaluation of different immobilization strategies, as well as the characterization of catalytic properties and the determination of thermodynamic parameters of a produced lipase from *G. candidum* (GCL) via submerged fermentation, in order to produce concentrated fatty acids by the hydrolysis of different vegetable oils (olive, cottonseed and palm kernel). Preliminary assays of free GCL immobilization on hydrophobic supports (octyl-agarose and octyl-silica) showed that they were not able to carry out the enzyme purification from fermentation broth as efficiently as polyhydroxybutyrate (PHB) via immobilization, due to the impurities in the fermentation broth. GCL produced was purified by precipitation with organic solvent in order to better analyze the immobilization on different types of support and by different immobilization methods, as via physical and ionic adsorption and multipoint covalent attachment. Among these methods, the maximum hydrolytic ($45.4 \pm 0,2$ U/ g of biocatalyst) and the highest percentage of activity recovered (22.8%) were observed for GCL immobilized by ionic adsorption in MANAE-agarose. The catalytic properties of GCL purified and immobilized on MANAE-agarose were evaluated, a greater lipase stability over a broad pH range, and high thermal stability were observed as compared to the free enzyme. Immobilization of GCL on MANAE-agarose decreased the activation energy (E_a) by 50% and increased the amount of product formed during hydrolysis reactions, it was verified by calculating kinetic parameters such as the maximum reaction rate ($v_{m\acute{a}x}$) and the Michaelis-Menten constant (K_m). The hydrolysis of olive oil by GCL immobilized on MANAE agarose, without the addition of emulsifiers, reached 100% hydrolysis in 120 minutes of reaction, whereas free enzyme reached 95.5% in 140 min. However, reusability tests of the biocatalyst showed that it retained around 50% of its original activity after second cycle, and only 5.5% after third cycle. The obtained results in the hydrolysis of cottonseed and palm kernel oils showed that free GCL expressed a maximum hydrolytic activity at pH 8.0 and temperature of 37 °C, for both used substrates. However, a greater activity was observed for cottonseed than for palm kernel, due the percentage of unsaturated fatty acids in cottonseed oil composition (\approx 71%) compared to palm kernel oil composition (\approx 19%).

Keywords: Lipase. *Geotrichum candidum*. Kinetic and thermodynamic parameters. Immobilization. Hydrolysis. Cottonseed. Palm kernel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação das enzimas estabelecida pela IUB.	18
Figura 2 –	Reações catalisadas por lipases.	20
Figura 3 -	Geotricum candidum em meio SDA (Ágar Sabouraud dextrose).	21
Figura 4 -	Hidrólise sequencial de um triacilglicerol catalisada pela lipase.	24
Figura 5 -	Representação esquemática das mudanças de energia durante a desnaturação térmica de enzimas. A quantidade mínima de energia (ED) deve ser fornecida para a enzima nativa (N) de modo que o estado de transição intermediário instável (U*) seja convertido na enzima desnaturada (D).	28
Figura 6 -	Métodos de imobilização de enzimas.	30
Figura 7 -	Imobilização da lipase por adsorção interfacial em suporte hidrofóbico a baixa força iônica.	31
Figura 8 -	Reação do suporte ativado com DVS com enzimas.	32
Figura 9 -	Preparação do suporte glioxil-octil-agarose.	34
Figura 10 -	Ativação da agarose com DVS.	35
Figura 11 -	A) Esquema representativo das etapas química envolvidas para a formação do suporte MANAE-agarose. B) Esquema de imobilização de uma lipase por adsorção iônica em MANAE-agarose.	36
Figura 12 -	Esquema representativo de formação de ponte de hidrogênio entre o Aerosil® e aglomeração para formação da rede tridimensional.	37
Figura 13 -	Biorreator agitado mecanicamente.	47
Figura 14 -	SDS-PAGE para a LGC: a) Marcadores moleculares; b) caldo de fermentação; c) primeira etapa de precipitação; d) segunda etapa de precipitação; e) terceira etapa de precipitação.	54
Figura 15 -	Efeito do pH e temperatura na atividade hidrolítica da LGC livre e imobilizada em MANAE-agarose, utilizando-se 50% (v/v) de óleo de oliva emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min. (a) pH, (reações realizadas a 37°C); (b) Temperatura, (reações realizadas em pH 6).	59
Figura 16 -	Determinação da energia de ativação, utilizando a equação de Arrhenius, para a LGC livre e imobilizada. O coeficiente de determinação (R^2) para ambos ajustes foi superior a 0,90.	61
Figura 17 -	Efeito da concentração de ácidos graxos livres (AGL) para a LGC livre e imobilizada. As reações foram realizadas a 45°C e pH 6, utilizando-se óleo de	

	oliva emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min.....	62
Figura 18 -	Curvas de inativação térmica para a LGC livre (pH 6), a 35 °C (■), 40 °C (□), 45 °C (•) e 50 °C (◊).....	64
Figura 19 -	Curvas de inativação térmica para a LGC imobilizada em MANAE-agarose (pH 6), a 35 °C (■), 40 °C (□), 45 °C (•) e 50 °C (◊).....	64
Figura 20 -	Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desnaturação (E_D) para a LGC, usando como substrato o óleo de oliva. Lipase livre (◊) e imobilizada (■).....	65
Figura 21 -	Perfil da reação de hidrólise para o óleo de oliva: LGC livre (◊), 37°C, pH 8,0 e GC imobilizada (■), 45°C e pH 6,0.....	68
Figura 22 -	Testes de reciclo para a reação de hidrólise para o óleo de oliva para a LGC imobilizada em MANAE-agarose, a 45°C e pH 6,0, em 120 min.	69
Figura 23 -	Efeito do pH na atividade hidrolítica da LGC livre. As reações foram realizadas a 37 °C, utilizando-se 50% (v/v) de óleo vegetal emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min.	70
Figura 24 -	Efeito da temperatura para atividade hidrolítica da LGC livre. As reações foram realizadas a pH 8,0 (tampão de fosfato de sódio, 100 mmol/L), utilizando-se 50% (v/v) de óleo vegetal emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min.	72
Figura 25 -	Efeito da concentração de ácidos graxos livres (AGL) na atividade hidrolítica da LGC livre. As reações foram realizadas a pH 8,0 (tampão fosfato de sódio, 100 mmol/L), a 37 °C e incubadas por 5 min em shaker orbital (200 rpm).	73
Figura 26 -	Curvas de inativação térmica para a atividade residual da LGC livre utilizando óleo de algodão. Os ensaios foram realizados a 35 °C (•), 40 °C (◊), 45 °C (■) e 50 °C (□).....	76
Figura 27 -	Curvas de inativação térmica para a atividade residual da LGC livre utilizando óleo de palmiste. Os ensaios foram realizados a 35 °C (•), 40 °C (◊), 45 °C (■) e 50 °C (□).....	76
Figura 28 -	Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desnaturação (E_d) para a LGC livre, usando como substrato o óleo de algodão (■) e o óleo de palmiste (□).	77

Figura 29 - Perfil da reação de hidrólise para a LGC livre a 37°C e pH 8,0: óleo de palmiste (○); óleo de algodão (■).79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos de alguns óleos vegetais utilizados para hidrólise enzimática.....	24
Tabela 2 - Parâmetros de imobilização obtidos para a LGC em diferentes carregamentos oferecidos, utilizando a enzima produzida sem a etapa de purificação.	50
Tabela 3 - Variáveis avaliadas (temperatura, atividade inicial e proporção solvente:caldo) para a precipitação da LGC e atividade recuperada.	53
Tabela 4 - Parâmetros de imobilização e atividade hidrolítica da LGC purificada e imobilizada em diferentes de suportes e distintos protocolos de imobilização a 25 °C (1 mg de proteína/ g de suporte).	55
Tabela 5 - Influencia do pH na imobilização da LGC purificada em MANAE-agarose a 25 °C, usando tampão fosfato de potássio (5mM) e carregamento de 1 mg de proteína/g de suporte.	57
Tabela 6 - Influencia do carregamento de proteína nos parâmetros de imobilização e atividade hidrolítica da LGC imobilizada no MANAE-agarose em pH 7.	58
Tabela 7 - Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a LGC livre e imobilizada em reações de hidrólise utilizando óleo de oliva emulsificado.	62
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a LGC livre e imobilizada incubada em diferentes temperaturas, utilizando como substrato o óleo de oliva.....	65
Tabela 9 - Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da LGC livre para as reações de hidrólise utilizando óleo vegetal emulsificado.	73
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a LGC livre incubada em diferentes temperaturas, utilizando como substrato os óleos de algodão e de palmiste.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	- Ácidos graxos livres
LGC	- Lipase de <i>Geotrichum candidum</i>
SDA	- Ágar Sabouraud dextrose
PHB	- Polihidroxibutirato
DVS	- Divinilsulfona
PMA	- Polimetacrilato
OCDVS	- Octil-divinilsulfona
OCGLX	- Octil-glioxil
SA	- Sílica Aerosil
PST-SDB	- Estireno-divinilbenzeno
MANAE	- Glioxil-amino
OCTES	- Octiltriétoxisilano
Å	- Angstrom
v/v	- Volume/Volume
m/v	- Massa/Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	ENZIMAS	18
3.2	LIPASES	19
3.3	A LIPASE DE <i>Geotrichum candidum</i>	21
3.4	REAÇÕES DE HIDRÓLISE CATALISADAS POR LIPASES	23
3.5	CINÉTICA ENZIMÁTICA	26
3.6	ESTABILIDADE TÉRMICA PARA A ENZIMA	27
3.7	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	29
3.7.1	Imobilização por adsorção	30
3.7.2	Imobilização por ligação covalente	32
3.7.3	Tipos de suportes para imobilização de enzimas	33
3.7.3.1	Agarose.....	33
3.7.3.2	Sílica coloidal (Aerosil).....	37
3.7.3.3	Polímeros hidrofóbicos.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	PRODUÇÃO DA LIPASE DE <i>G. candidum</i>	39
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA LGC BRUTA	40
4.2.1	Efeito do pH e temperatura	40
4.2.2	Parâmetros cinéticos	40
4.2.3	Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos	41
4.3	PURIFICAÇÃO DA LGC POR PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO	42
4.4	IMOBILIZAÇÃO DA LGC EM SUPORTES SÓLIDOS	42
4.4.1	Preparo dos suportes	43
4.4.2	Ensaio preliminares para a imobilização da LGC	44
4.4.3	Imobilização da LGC em diferentes suportes	44
4.4.4	Parâmetros de imobilização	45
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA LGC IMOBILIZADA EM MANAE-AGAROSE	46

4.5.1	Efeito do pH e do carregamento de proteína	46
4.5.2	Parâmetros cinéticos	46
4.5.3	Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos	46
4.6	APLICAÇÃO DA LGC LIVRE E IMOBILIZADA	47
4.6.1	Hidrólise de óleos vegetais	47
4.6.2	Testes de reciclo para o derivado MANAE-agarose	48
4.7	ENSAIOS ANALÍTICOS	48
4.7.1	Determinação da atividade hidrolítica	48
4.7.2	Análise de eletroforese (SDS-PAGE)	49
4.7.3	Análise para determinação de proteína	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	ENSAIOS PRELIMINARES PARA IMOBILIZAÇÃO DA LGC PRODUZIDA SEM PURIFICAÇÃO	50
5.2	PURIFICAÇÃO DA LGC POR PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO	52
5.3	IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE PURIFICADA POR DIFERENTES PROTOCOLOS	54
5.3.1	Influência do pH na imobilização da LGC em MANAE-agarose	57
5.3.2	Influência do carregamento de proteína na imobilização da LGC em MANAE-agarose	58
5.4	DETERMINAÇÃO DO PH E TEMPERATURA ÓTIMOS EM MEIO AQUOSO	59
5.5	EFEITO DO SUBSTRATO	61
5.6	ENSAIOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA	63
5.7	EMPREGO DA LGC LIVRE E IMOBILIZADA NA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE OLIVA	67
5.7.1	Reciclo para o derivado MANAE-agarose	69
5.8	EMPREGO DA LGC LIVRE NA HIDRÓLISE DE OUTROS ÓLEOS VEGETAIS	70
5.8.1	Propriedades catalíticas da LGC livre em meio aquoso	70
5.8.2	Estabilidade térmica para a LGC livre	74
5.8.3	Aplicação da LGC livre na hidrólise de diferentes óleos vegetais	79
6	CONCLUSÕES	81
7	TRABALHOS FUTUROS	83
	REFERÊNCIAS	84

APÊNDICES	92
------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas especializadas que funcionam como catalisadores biológicos extremamente eficientes acelerando as reações químicas. Muitos processos tecnológicos utilizam biocatalisadores em substituição aos catalisadores químicos convencionais, pois aqueles apresentam vantagens como a atuação em condições brandas de reação, compatibilidade com os substratos sintéticos, catálise de reações de síntese e degradação, e seletividade quanto ao tipo de reação (WARNER; CANNON; DYE, 2004).

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas que na presença de água catalisam a reação de hidrólise de triacilgliceróis para produção de glicerol e ácidos graxos livres (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; MIRANDA et al., 2014; RAMOS et al., 2015). Algumas lipases também são capazes de catalisar reações de síntese em meios com baixa concentração de água, como a esterificação, interesterificação, alcoólise e acidólise, mantendo alto grau de enantio e regioseletividade (REIS et al., 2009; SHIMADA et al., 1992). Estas enzimas podem ser encontradas em animais, plantas e micro-organismos (BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004; JACOBSEN et al., 1989). O *Geotrichum* sp. é conhecido por ser um micro-organismo capaz de produzir diferentes tipos de lipases extracelulares (CHARTON; MACRAE, 1992). A produção de lipases por *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) necessita de um indutor, o qual pode ser um óleo vegetal adicionado ao meio de cultivo, sendo relatado na literatura sua preferência por substratos insaturados de cadeia longa (BRABCOVÁ et al., 2013; RAMOS et al., 2015; ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

O interesse na produção de lipases tem aumentado cada vez mais nas últimas décadas devido ao seu grande potencial em aplicações industriais como aditivos em alimentos, produtos químicos finos, detergentes, tratamento de águas residuais, produtos farmacêuticos, couro e ensaios medicinais (BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004). A sua utilização na forma solúvel tem como desvantagens aplicações limitadas pela sua sensibilidade à temperatura, pela necessidade de purificação do processo, e também pelas dificuldades de recuperação e reciclagem (SILVA et al., 2014). Visando melhorar a baixa estabilidade, as dificuldades de recuperação e a utilização em diferentes configurações de reatores, tem-se amplamente avaliado técnicas de imobilização de lipases em diferentes suportes, tais como polihidroxibutirato (PHB), polimetacrilato (PMA), sílica e agarose ativado com diferentes grupos químicos (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015b; LAGE et al., 2016; MENDES et al., 2011a; PALOMO et al., 2005; RUEDA et al., 2015; SILVA et al., 2014; VOLPATO et al., 2010; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Entretanto, pouquíssimos

trabalhos foram reportados para a imobilização da lipase de *G. candidum* (LGC) em diferentes suportes, bem como a avaliação de suas propriedades catalíticas e sua estabilidade térmica. Ramos et al., (2015) avaliaram o uso de partículas de PHB como suporte na imobilização da LGC, visando posterior aplicação em meio orgânico para catalisar a síntese de linoleato de etila.

O objetivo deste trabalho foi preparar um biocatalisador altamente ativo de lipase de *Geotrichum candidum* e analisar as perspectivas de sua posterior aplicação na hidrólise de óleos vegetais para produção de ácidos graxos concentrados. A hidrólise de triacilgliceróis para a produção de ácidos graxos livres e glicerol é uma reação essencial em processos industriais de óleos e gorduras naturais, cujos produtos são materiais básicos muito importantes devido a sua ampla gama de aplicações, incluindo revestimentos, surfactantes, fabricação de sabão, adesivos, especialmente óleos lubrificantes, shampoos e outros produtos de higiene pessoal (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002; ROONEY; WEATHERLEY, 2001).

Na tecnologia convencional, o processo de Colgate-Emery utilizado para a hidrólise de gorduras e óleos na produção de ácidos graxos exige a utilização de elevada temperatura e equipamentos de alta pressão (TSAI; CHIANG, 1991). Operando nestas condições, reações indesejáveis podem ocorrer, tais como oxidação, desidratação e interesterificação de triacilgliceróis (AVELAR et al., 2013; KOSUGI; TANAKA; TOMIZUKA, 1990; SHIOMORI et al., 1995). A fim de solucionar estes problemas, a hidrólise de triacilgliceróis pela rota enzimática é uma abordagem vantajosa para substituir as tecnologias químicas atuais, uma vez que pode ser realizada em condições de temperatura ambiente visando economizar energia e minimizar a degradação térmica, além disso, apresenta uma elevada seletividade, gerando produtos com elevado grau de pureza e uma menor quantidade de produtos secundários (LI; WU, 2009; MALCATA; HILL; AMUNDSON, 1991; MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002; YİĞİTOĞLU; TEMOÇIN, 2010).

Para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que reporta a utilização de diferentes estratégias de imobilização para a lipase de *G. candidum* visando sua posterior aplicação em meio aquoso para catalisar a hidrólise de triacilgliceróis. Neste trabalho, as propriedades do biocatalisador imobilizado também foram determinadas tal como pH e temperatura ótimos, e testes de estabilidade térmica. A influência de variáveis como pH, temperatura e concentração do substrato também foram verificados a fim de obter as condições ótimas de operação. Por fim, a estabilidade operacional do biocatalisador pela hidrólise de óleo vegetal foi analisado em três ciclos consecutivos para a produção de ácidos graxos concentrados.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral e os objetivos específicos estão descritos a seguir.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse projeto é a avaliação de diferentes estratégias de imobilização, caracterização das propriedades catalíticas e determinação dos parâmetros termodinâmicos para a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, via fermentação submersa, para a produção de ácidos graxos concentrados, utilizando-se diferentes óleos vegetais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este projeto de pesquisa envolve diversos objetivos específicos, todos em conformidade com o objetivo geral. Estes podem ser descritos como:

- a) Produzir a lipase de *G. candidum* por fermentação submersa;
- b) Estabelecer um método de purificação para a lipase produzida que permita um bom percentual de recuperação da enzima;
- c) Avaliar diferentes técnicas de imobilização para a enzima purificada;
- d) Comparar o desempenho da enzima purificada e sem purificação para a etapa de imobilização;
- e) Caracterizar as propriedades biocatalíticas e obter os parâmetros termodinâmicos para a lipase imobilizada para o melhor resultado obtido no item iii.
- f) Comparar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos entre a lipase livre e imobilizada;
- g) Aplicar o biocatalisador (livre e imobilizado) na hidrólise do óleo de oliva;
- h) Verificar a estabilidade operacional da lipase produzida e imobilizada para a reação de hidrólise em óleo de oliva.
- i) Caracterizar as propriedades biocatalíticas da lipase livre para diferentes óleos vegetais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão apresentará os principais assuntos relacionados a este trabalho, incluindo uma visão sobre as enzimas, com foco nas lipases e a lipase de *Geotrichum candidum*, abordando também os estudos cinéticos e termodinâmicos, além da apresentação dos métodos de imobilização de enzimas e os principais suportes utilizados na etapa de imobilização.

3.1 ENZIMAS

As enzimas são muito importantes para a maioria das reações químicas dos sistemas biológicos, pois sem elas as reações seriam muito lentas, o que causaria a formação de produtos em quantidades inadequadas para os respectivos processos. Elas são biodegradáveis e atóxicas, possibilitam a ocorrência de uma reação sem serem consumidas e possuem a capacidade em atuar em concentrações muito baixas e em condições específicas de temperatura e pH (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; ASGHER et al., 2014). Alguns fatores interferem na atividade enzimática, como o pH e a temperatura, sendo que cada enzima possui um pH ótimo e uma temperatura ótima de atuação, porém, estes fatores também podem interferir negativamente dependendo das condições utilizadas, causando a degradação da enzima e tornando-a inativa (NELSON; COX, 2011).

Segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB), as enzimas são classificadas em seis classes principais conforme está apresentado pela Figura 1:

Classificação	Reação que catalisam	Enzimas
Oxido-redutases	Reações de óxido-redução. Transferência de átomos de O e H ou elétrons de um substrato para o outro.	Hidrogenase; Oxidase; Peroxidase; Hidroxilases; Oxigenases.
Transferases	Reações de transferência de grupos específicos de um composto para o outro.	Aminotransferases; Acetiltransferase; Cinasas; Fosforilases; Frutossiltransferase
Hidrolases	Reações hidrolíticas	Lipases; Proteases; Amilases; Pectinases.
Liasas	Reações reversíveis, não hidrolíticas de remoção de grupos da molécula de substrato.	Descarboxilases; Aldolases
Isomerases	Reação de isomerização transformam isômeros entre si (cis e trans).	Glicose-isomerase.
Ligases	Reação de síntese de novos compostos, derivados da junção de duas moléculas.	Piruvato carboxilase

Figura 1 - Classificação das enzimas estabelecida pela IUB.

Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2011).

Elas podem ser de origem vegetal, animal e microbiana, obtidas através de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. As enzimas microbianas apresentam maior interesse industrial devido a maior facilidade na ampliação de escala e na diversidade de trabalhos possíveis pela grande variedade microbiana existente (BON, FERRARA, CORVO, 2008).

As enzimas são moléculas de proteínas com estrutura primária formada a partir de cadeias lineares de aminoácidos. A formação das estruturas secundárias e terciárias é baseada no enovelamento das sequências de aminoácidos. Elas podem também, a partir das interações de subunidades e seu arranjo espacial, formar uma estrutura quaternária com propriedades específicas. Em sua maior parte, as enzimas podem sofrer desnaturação pelo aumento de temperatura, isto é, ocorrem desdobramentos em suas estruturas e alterações na conformação tridimensional, tornando-as inativas e conseqüentemente perdendo sua função enzimática (NELSON; COX, 2011). Os parâmetros termodinâmicos são determinados para se avaliar a estabilidade térmica, a qual está relacionada com a resistência à desnaturação das enzimas pela ação da temperatura (SAQIB et al., 2010).

A quantificação de enzima presente ou ativa em um processo é complicada em termos absolutos (massa, miligramas), pois deve-se considerar uma pequena quantidade da enzima em estado inativo. Sabendo-se disso, o parâmetro mais adequado é a atividade da enzima, a qual é usualmente medida em termos de unidades de atividade (U ou UI), definida como a quantidade de enzimas que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto de reação, nas condições experimentais estabelecidas. Por esse motivo, a comercialização das enzimas é realizada em termos de atividade (UI) ou pela atividade específica (UI/mg de proteína) (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

3.2 LIPASES

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações ésteres de ácidos carboxílicos em meios aquosos (DE CASTRO et al., 2004; GUTIÉRREZ-AYESTA; CARELLI; FERREIRA, 2007). Sua atuação única com substratos insolúveis em água, na interface óleo-água ou água-óleo de soluções emulsificadas, permite catalisar as reações com alta seletividade devido à sua especificidade e estabilidade de acordo com o substrato, além do tamanho da cadeia do ácido graxo e sua posição no glicerol. Suas propriedades as tornam extremamente versáteis e muito atraentes para diferentes aplicações, incluindo a indústria oleoquímica, de alimentos, de detergentes, farmacêutica, dentre outras (CHOUDHURY; BHUNIA, 2015; COLLA, 2012; MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2013).

No processo de hidrólise, a molécula da lipase juntamente com a do lipídeo forma um complexo. Na presença de água em excesso no sistema, este complexo libera parte do ácido graxo que recebeu a molécula de água. A reação inversa (esterificação) pode acontecer quando há o excesso de ácidos graxos em quantidades pequenas de água (BON; FERRARA; CORVO, 2008). Algumas lipases também são capazes de catalisar outras reações de síntese em meios com baixa concentração de água, como a interesterificação, alcoólise, glicerólise e acidólise (Figura 2) (REIS et al., 2009; SHIMADA et al., 1992).

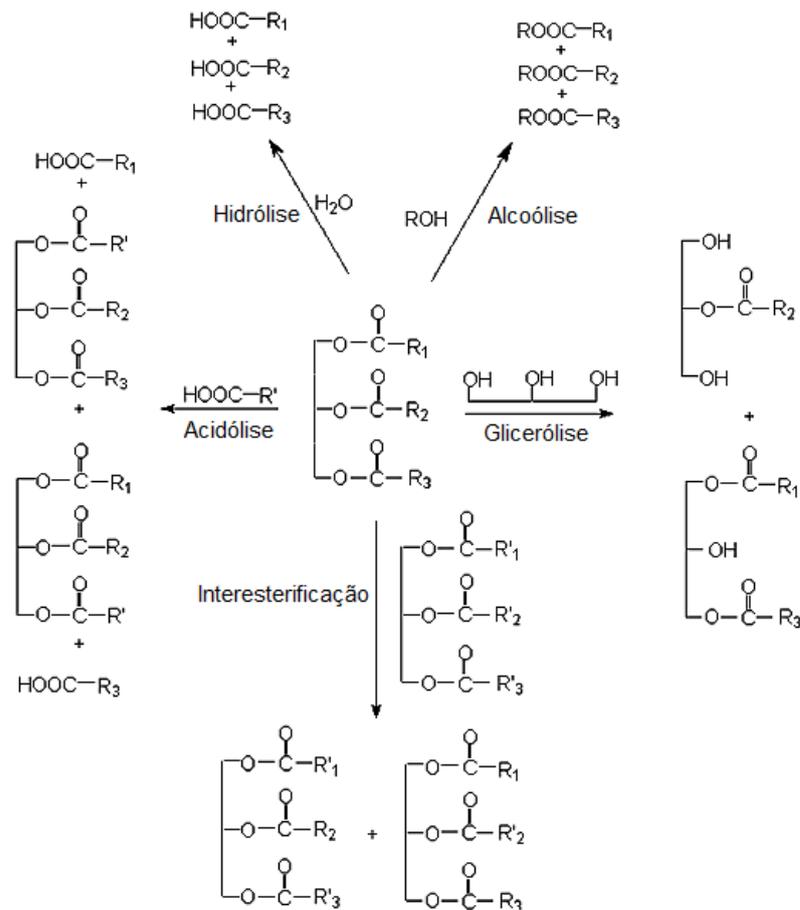


Figura 2 – Reações catalisadas por lipases.

Fonte: Adaptado de (DE CASTRO et al., 2004).

As lipases apresentam boa estabilidade em soluções aquosas neutras e temperatura ambiente. A massa molecular dessas enzimas é encontrada na faixa de 20 a 75 kDa, e apresentam atividade ótima entre 30 °C e 40 °C, podendo ser diferente conforme a origem da lipase. Elas podem ter diferentes especificidades e ainda apresentar enantioseletividade (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; DE CASTRO et al., 2004).

As lipases podem ser encontradas em animais, vegetais e micro-organismos. Inicialmente, as lipases eram produzidas pelo pâncreas animal e posteriormente a produção dessas enzimas passou a ser de origem microbiana, por apresentarem vantagens como a

produção em larga escala, um menor custo de produção, e maior diversidade em suas propriedades enzimáticas, tais como elevada especificidade, baixos valores de temperatura e pH de atuação, além da capacidade de catalisarem reações de síntese na presença de solventes orgânicos. As lipases microbianas são, geralmente, produzidas por processos fermentativos, que podem ocorrer em superfície sólida ou em regime submerso. A escolha do tipo de fermentação a ser empregado, bem como os parâmetros a serem adotados nas condições de cultivo (pH, temperatura, agitação, oxigenação, etc) irá depender do tipo de micro-organismo utilizado, de características referentes à lipase produzida (intracelular ou extracelular), mas sempre visando promover uma maior facilidade na obtenção e purificação dessas enzimas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; MALDONADO, 2017; MALDONADO et al., 2012).

Os fungos filamentosos são excelentes produtores de lipase, sendo que os maiores produtores são de espécies do gênero *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, e *Thermomyces*, além da levedura *Candida rugosa* (GONÇALVES, 2007; MENDES, 2009; VOLPATO et al., 2010).

3.3 A LIPASE DE *Geotrichum candidum*

O *Geotrichum candidum* é um fungo filamentoso (Figura 3) que produz lipases somente na presença de triglicerídeos ou ácidos graxos no meio de fermentação (BAILLARGEON; BISTLINE; SONNET, 1989; JACOBSEN et al., 1989; STRÁNSKÝ et al., 2007).



Figura 3 - *Geotrichum candidum* em meio SDA (Ágar Sabouraud dextrose).

Fonte: do Autor.

Seu cultivo apresenta problemas inerentes como a elevada demanda de oxigênio devido ao crescimento celular e o aumento aparente da viscosidade do caldo dificultando a transferência de massa e diminuindo a concentração de oxigênio dissolvido. Esses fatores limitam o crescimento do micro-organismo e a própria biossíntese do produto de interesse (BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004; MALDONADO et al., 2012).

As lipases de *G. candidum* são conhecidas por atuarem de forma específica, hidrolisando, preferencialmente, as ligações ésteres de ácidos graxos de cadeias longas insaturadas com dupla ligação *cis* no C-9. As ligações ésteres com ácidos graxos saturados ou sem instauração no C-9 são lentamente hidrolisados por lipases não específicas (JACOBSEN; OLSEN; ALLERMANN, 1990). Devido à sua especificidade, as lipases de *G. candidum* vêm sendo muito estudadas para reações de alcoólise de óleos que contenham ácidos graxos poli-insaturados, para produção de aromas e em reações de enantiosseletividade (BRABCOVÁ et al., 2013; ZAREVÚCKA et al., 2005). Ainda, segundo Jacobsen et al. (1989), quando um meio sintético é utilizado na fermentação para o *G. candidum*, a rota para produção da lipase é muito favorecida, não se verificando proteínas contaminantes presentes no meio de fermentação.

A LGC é uma proteína α/β e seu sítio ativo é composto pela tríade Ser-His-Asp/Glu, o qual é localizado no centro da molécula e encontra-se inacessível ao substrato. Isto sugere que a enzima está na sua forma “fechada”, onde o sítio catalítico é recoberto por uma tampa polipeptídica, chamada de “lid”. A ativação interfacial ocorre quando a presença de um substrato hidrofóbico induz modificações na conformação da estrutura expondo o sítio ativo da lipase (forma “aberta”) para o meio reacional (SCHRAG; CYGLER, 1993). Em sua estrutura, são encontradas duas ligações dissulfeto (força de ligação maior que pontes de hidrogênio) e 22 resíduos de lisina (podem formar interações iônicas), além disso, essa lipase possui ponto isoelétrico (pI) de 4,6, volume molecular de 65 Å X 60 Å X 45 Å (Å = 10⁻¹⁰ m) (SCHRAG et al., 1991) e diâmetro molecular de 69,5 Å, calculado pela equação 1.

$$R = \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}} \therefore D = 2R \quad (1)$$

em que: R é o raio molecular, V é o volume molecular e D é o diâmetro molecular de moléculas de LGC (LAGE et al., 2016).

As lipases produzidas por *G. candidum* são capazes de catalisar ambas reações de hidrólise (em meio aquoso) e síntese de ésteres, e suas especificidades variam de acordo com a linhagem tanto quanto a capacidade hidrolítica para formação de di- e monoacilglicerol, glicerol

e ácidos graxos livres. Além disso, o meio em que elas são induzidas influencia no perfil dos ácidos graxos hidrolisados (MALDONADO, 2017).

Entretanto, a grande maioria dos trabalhos em literatura reportam sobre as condições de cultivo ou de purificação das lipases de *G. candidum*. (BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2007; BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004; MALDONADO et al., 2012). Até o momento, há poucos trabalhos sobre a imobilização desta enzima e estes estão relacionados ao emprego da imobilização como forma de purificação da mesma (BRABCOVÁ et al., 2013). Muito pouco foi relatado sobre o emprego da imobilização como técnica para melhorar a estabilidade da enzima e assim proporcionar o seu emprego em reações de interesse no âmbito industrial (DE MORAIS et al., 2016; RAMOS et al., 2015; SONNET; MCNEILL; JUN, 1994).

Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004) realizaram um estudo para a estabilidade térmica da enzima livre de *G. candidum* e observaram que esta possui uma baixa estabilidade, com uma meia-vida de 3,6 h (37°C e pH 7,0), dificultando desta forma o emprego da enzima livre em reações de interesse. A imobilização da mesma lipase em polihidroxibutirato (PHB), possibilitou que sua meia-vida aumentasse para 8 h (37°C, pH 7,0) (RAMOS et al., 2015).

3.4 REAÇÕES DE HIDRÓLISE CATALISADAS POR LIPASES

A utilização de recursos renováveis para produção de ácidos graxos concentrados a partir da hidrólise de triacilgliceróis é uma fonte importante no que diz respeito à exploração, pois diversos produtos de alto valor agregado podem ser produzidos por meio destas matérias primas naturais (AVELAR et al., 2013).

As lipases são utilizadas como biocatalisadores em reações de hidrólise, em que as ligações de éster de triacilgliceróis são clivadas em um meio aquoso. O que ocorre é uma hidrólise sequencial de grupos acila no glicerídeo, ou seja, em determinado momento a mistura reacional pode conter tri, di e monoacilgliceróis, água, glicerol e ácidos graxos (Figura 4) (DE CASTRO et al., 2004).

A utilização de óleos vegetais para a produção de ácidos graxos a partir da reação de hidrólise catalisada pela lipase é uma alternativa importante na redução de requerimentos energéticos e na prevenção da decomposição de alguns ácidos graxos que ocorrem em processos químicos convencionais. Alguns óleos vegetais são reportados na literatura para a produção de ácidos graxos concentrados por meio da reação de hidrólise utilizando lipases (Tabela 1) (DE CASTRO et al., 2004; SANTOS et al., 2013).

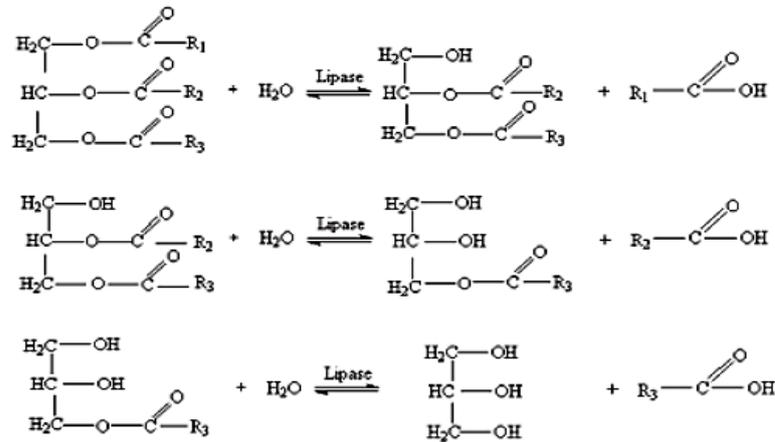


Figura 4 - Hidrólise sequencial de um triacilglicerol catalisada pela lipase.

Fonte: Adaptado de (DE CASTRO et al., 2004).

Lipases provenientes de diferentes fontes mostram diferentes especificidades por substratos. Em termos químicos da enzima-substrato, a atividade da lipase pode ser caracterizada de acordo com a tipo-seletividade (capacidade de hidrolisar um tipo de éster de ácido graxo), régio-seletividade (habilidade para hidrolisar grupos ésteres carboxílicos nas posições 1,3 do triacilglicerol comparado com a posição 2 do triacilglicerol) e a estéreo-seletividade (em que a lipase diferencia dois enantiômeros em um substrato racêmico) (STRÁNSKÝ et al., 2007).

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos de alguns óleos vegetais utilizados para hidrólise enzimática.

Ácidos Graxos	Composição (% m/m)						
	Palmiste	Palma	Oliva	Algodão	Canola	Babaçu	Soja
Caprílico (C _{8:0})	4,30	-	-	-	-	3,50	-
Cáprico (C _{10:0})	3,50	-	-	-	-	4,50	-
Láurico (C _{12:0})	47,2	0,10	-	0,20	-	44,7	-
Mirístico (C _{14:0})	15,6	1,20	-	0,80	-	17,5	-
Palmítico (C _{16:0})	8,60	46,8	11,4	23,9	4,70	9,7	10,7
Palmitoleico (C _{16:1})	-	-	0,65	1,20	0,14	-	-
Esteárico (C _{18:0})	2,00	3,80	2,60	2,70	1,65	3,10	3,00
Oleico (C _{18:1})	15,9	37,6	80,6	18,2	66,0	15,2	24,0
Linoleico (C _{18:2})	2,80	10,5	4,20	52,5	21,2	1,80	56,7
Linolênico (C _{18:3})	-	-	0,60	0,40	5,20	-	5,40
Eicosanóico (C _{20:0})	-	-	0,20	0,10	0,90	-	0,10
Massa molecular média (g/mol)	222,9	269,4	279,6	273,9	280,9	223,9	278,6

Fonte: Adaptado de (AVELAR et al., 2013; CAMPESTRE ind. e com. óleos vegetais Ltda.; SANTOS et al., 2013;).

Diferentes pesquisas vêm sendo realizadas utilizando a catálise enzimática para reações de hidrólise utilizando óleos vegetais em temperaturas amenas a fim de reduzir o consumo de energia no processo e minimizar a degradação térmica dos produtos formados (AVELAR et al., 2013; RAMOS et al., 2015; SANTOS et al., 2013; SERRI; KAMARUDIN; ABDUL RAHAMAN, 2008).

Piazza et al., (1989) verificaram a produção de ácidos graxos por meio da hidrólise de óleo de sebo bovino pela lipase de sementes de aveia (*Avena sativa* L.), em que observaram em análises anteriores com a hidrólise de óleo de oliva a necessidade de adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) para promover a hidrólise do óleo de sebo. Não foi verificado a completa conversão de óleo de sebo para um tempo de reação entre 2 e 18 horas, mas verificou-se a produção predominante para ácidos graxos insaturados comparado à fração de ácidos graxos saturados produzidos, sendo alta a seletividade da lipase de aveia para o ácido oleico (80% do total de ácidos graxos insaturados produzidos).

Wang et al., (1989) observaram uma conversão de 25% de óleo de oliva em 30 minutos de reação, hidrolisada pela lipase de *Candida rugosa*, para um sistema a 1100 rpm de agitação tanto em pH 5 como para pH 7, sendo que a adição de cálcio na concentração 5mM influencia positivamente na hidrólise do óleo em estudo.

Serri, Kamarudin e Rahaman (2008) obtiveram resultados com estudos primários de reações de hidrólise de óleo de palma em solvente orgânico (iso-octano) utilizando lipase de *Candida rugosa* foram estudados, em que a conversão de óleo em ácidos graxos à 45°C, razão de 1:1 de óleo-meio aquoso e 7,46 kU/ml de enzima foi determinada. Porcentagens acima de 95% foram encontradas após 90 minutos de reação.

Cavalcanti-Oliveira et al., (2011) avaliaram a reação de hidrólise de óleo de soja catalisada pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TL 100L) e observaram que as melhores taxas de conversão foram obtidas por reações conduzidas com 2,3% (v/v) de lipase, 50 e 60% (v/v) de óleo a 60°C, sendo que para estas concentrações de ácidos graxos livres (AGL), foram encontrados valores de $91 \pm 0,9\%$ AGL em 48 horas e $93 \pm 0,8\%$ AGL em 72 horas respectivamente.

Avelar et al., (2013) analisaram a hidrólise de diferentes óleos vegetais (óleos de soja, canola e oliva) pela lipase extraída de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.), em que altas atividades foram encontradas para óleos ricos em ácido linoleico ($\text{C}_{18:2}$) e linolênico ($\text{C}_{18:3}$) comparado com um óleo rico em ácido oleico ($\text{C}_{18:1}$), sendo atingido conversões acima de 80% na reação de hidrólise enzimática, em que o valor máximo encontrado foi de $88,2 \pm 6,8\%$ após 3 horas de reação para o óleo de canola.

Segundo Santos et al., (2013) também por meio do uso de lipase extraída de sementes de mamona, observaram a completa hidrólise de óleos de babaçu, palma e soja, alcançada após 60, 70 e 80 minutos de reação, respectivamente, sob condições ótimas estudadas.

3.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Uma das áreas fundamentais da enzimologia é a cinética enzimática, caracterizada pelo estudo da velocidade de uma reação catalisada por uma enzima. Dentre os modelos existentes, o modelo proposto por Michaelis-Menten é um dos mais conhecidos e utilizados. Este modelo está baseado no conceito da formação do complexo enzima-substrato (ES) como intermediário do processo de catálise enzimática. Os pesquisadores observaram que a velocidade de uma reação enzimática dependia da concentração dessa enzima, além de ser afetada consideravelmente pela concentração do substrato. (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; BON; FERRARA; CORVO, 2008).

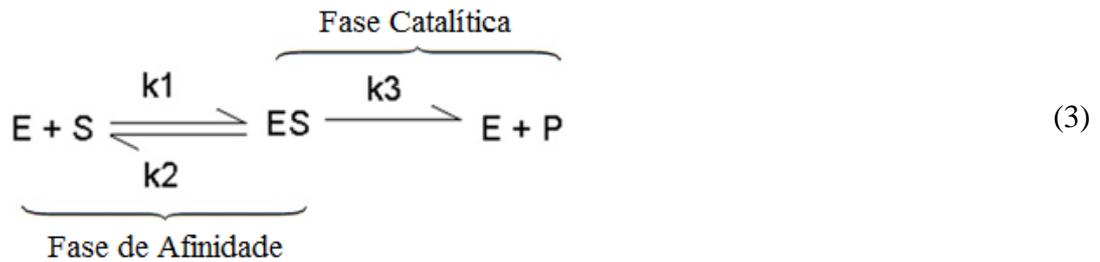
A equação de Michaelis-Menten (equação 2) mostra a relação da velocidade inicial da reação em função da concentração inicial do substrato para uma concentração de enzima constante.

$$v = v_{\text{máx}} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

em que: v é a velocidade de reação (μmol de substrato/min de reação), $v_{\text{máx}}$ é a velocidade de reação máxima (μmol de substrato/min de reação), $[S]$ é a concentração do substrato (mM), e K_m é a constante de Michaelis-Menten (mM) (NELSON; COX, 2011).

Nesse modelo, a enzima se complexa com o substrato de maneira reversível formando ES (fase de afinidade). Na fase catalítica, o contato entre enzima e substrato para a formação do complexo ES e seu rompimento ocorre de imediato, com isso, forma-se o produto (P), liberando-se a enzima livre (E). A expressão que representa as duas fases para o modelo de Michaelis-Menten é mostrada pela equação 3 (NELSON; COX, 2011).

A constante K_m representa a maior ou menor afinidade da enzima com o substrato, o qual é único para cada reação enzimática. Quanto menor o valor de K_m , ou maior o valor de k_1 , maior é a afinidade da enzima pelo substrato. O K_m corresponde à concentração de substrato necessária para que a velocidade de reação enzimática seja a metade da velocidade máxima de uma reação (SALEEM et al., 2005).



em que: k_1 é a constante de velocidade de formação do complexo, k_2 é a constante de velocidade de dissociação do complexo e k_3 é a constante de velocidade de dissociação do complexo formando o produto (BUSTOS-JAIMES et al., 2010).

A constante da taxa catalítica (K_{cat}) (equação 4), que representa a quantidade máxima de reação catalisada por minuto, a energia livre de Gibbs requerida para a formação do complexo ES (ΔG_{E-S}^*) (equação 5), a qual corresponde à fase de afinidade, e a energia livre de Gibbs requerida para a liberação do produto formado (ΔG_{E-T}^*) (equação 6), a qual corresponde à fase catalítica do processo, são parâmetros importantes na análise das propriedades cinéticas e termodinâmicas da enzima com o substrato (SALEEM et al., 2005).

$$k_{cat} = \frac{v_{m\acute{a}x}}{[E_t]} \tag{4}$$

$$\Delta G_{E-S}^* = -RT \ln \frac{1}{K_M} \tag{5}$$

$$\Delta G_{E-T}^* = -RT \ln \frac{K_{cat}}{K_M} \tag{6}$$

em que $[E_i]$ é a concentração total de lipase ($\mu\text{mol/mL}$), R corresponde a constante universal dos gases ($8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ/mol.K}$) e T a temperatura absoluta (K).

3.6 ESTABILIDADE TÉRMICA PARA A ENZIMA

Os parâmetros termodinâmicos, tais como a variação da entropia (ΔS^*), entalpia (ΔH^*) e energia livre de Gibbs (ΔG^*) são essenciais para analisar a estabilidade de proteínas livres versus imobilizadas, uma vez que eles possuem a capacidade de demonstrar o comportamento enzimático com relação à sua desnaturação térmica.

As moléculas das enzimas são altamente susceptíveis ao processo de desnaturação térmica quando expostas a condições fora do seu microambiente. O processo de desnaturação envolve a alteração de estruturas secundárias ou terciárias que podem afetar a conformação nativa da enzima e sua estabilidade (BADGUJAR; BHANAGE, 2017)

A desnaturação térmica das enzimas requer uma entrada de uma quantidade mínima de energia, conhecida como energia de desnaturação (E_D), que deve ser fornecida à enzima nativa para iniciar o processo de desnaturação (Figura 5). O processo de desnaturação prossegue por um estado de transição intermediária instável (U^*). Enquanto a entrada inicial de energia (na forma de calor) for menor que o valor de E_D , o intermediário instável (U^*) formado poderá voltar ao estado natural da enzima (N), após o seu resfriamento (perda do calor). Esta barreira de ativação é crucial para a estabilidade e sobrevivência das biomoléculas na natureza. Uma vez superada a barreira E_D , a enzima é desnaturada (D) e, assim, ela não pode mais voltar para sua forma nativa. Isso é conhecido como a desnaturação térmica irreversível da enzima (SAQIB et al., 2010)

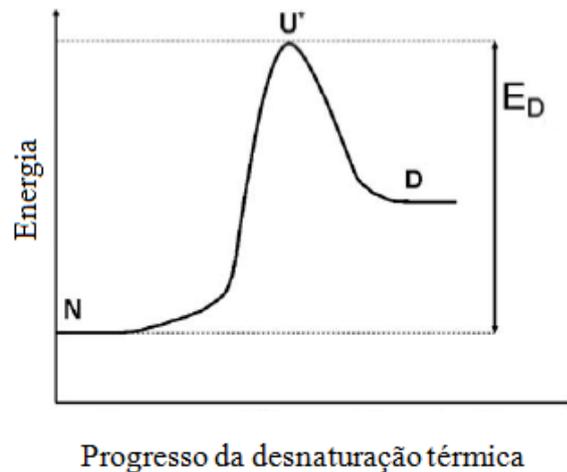


Figura 5 - Representação esquemática das mudanças de energia durante a desnaturação térmica de enzimas. A quantidade mínima de energia (E_D) deve ser fornecida para a enzima nativa (N) de modo que o estado de transição intermediário instável (U^*) seja convertido na enzima desnaturada (D).

Fonte: Adaptado de (SAQIB et al., 2010).

A energia de desnaturação E_D está também diretamente relacionada a um importante parâmetro termodinâmico; a entalpia de ativação da desnaturação ΔH_D (equação 7), que é a quantidade total de energia necessária para levar a enzima do estado fundamental para o intermediário instável (Figura 5). Como regra geral, quanto maior for a E_D , maior será a ΔH_D^* . Assim, valores altos e positivos de E_D e ΔH_D são, portanto, associados à maior estabilidade térmica da enzima (MARANGONI, 2003).

$$\Delta H_D^* = E_d - RT \quad (7)$$

Embora um valor elevado para a entalpia de ativação da desnaturação (ΔH_D) sugira que a enzima seria termoestável, também é importante verificar os outros dois parâmetros termodinâmicos ΔG_D^* e ΔS_D^* . A energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação, ΔG_D^* (equação 8), é considerado um indicador mais confiável da estabilidade da enzima. Um menor valor ou valor negativo para a mudança na energia livre de Gibbs indica o favorecimento da reação de desnaturação térmica, portanto, uma menor estabilidade da proteína (MARANGONI, 2003).

$$\Delta G_D^* = -RT \cdot \ln \left(\frac{k_d h}{k_B T} \right) \quad (8)$$

em que: os parâmetros h e k_B correspondem respectivamente à constante de Planck, $11,04 \times 10^{-36}$ (J/min), e à constante de Boltzmann, $1,38 \times 10^{-23}$ (J/K). A temperatura experimental é representada por T (K) (KUMAR et al., 2013).

A desnaturação térmica das enzimas também resulta num aumento da entropia (ΔS_D^*). Isto resulta em valores positivos para a entropia da reação de desnaturação (equação 9), pois a aleatoriedade ou desordem é aumentada na transição do estado fundamental para o estado intermédio instável (KUMAR et al., 2013).

$$\Delta S_D^* = \frac{\Delta H_D^* - \Delta G_D^*}{T} \quad (9)$$

3.7 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização é um recurso utilizado para o desenvolvimento de processos contínuos com possibilidade de reutilização das enzimas, diminuindo os custos operacionais, auxiliando também a etapa de separação, evitando a formação de subprodutos e aumentando a estabilidade da enzima. Esse processo ocorre quando a enzima é fixada em um suporte sem que a atividade catalítica seja afetada consideravelmente, protegendo a enzima contra fatores adversos do meio. Entretanto, a imobilização também pode causar perdas de atividade e possuir outras desvantagens como o custo do suporte e da operação de imobilização (ADLERCREUTZ, 2013; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

O método a ser escolhido para a imobilização de enzimas, bem como o suporte, depende das características da enzima e também das condições de uso do sistema imobilizado. Assim, é necessário conhecer a reação desejada, as condições do meio reacional, além das variações causadas na estabilidade, atividade, pH, dentre outros fatores, ou seja, não existe um método comum a todos os processos. Neste sentido, o suporte e o método mais adequado para cada caso

é aquele que fornecerá a maior atividade recuperada após a imobilização, além de outras vantagens como maior estabilidade térmica e maior faixa de pH de atuação da enzima (DALLA-VECCHIA et al., 2005; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011b).

Alguns métodos são amplamente descritos na literatura e utilizados para minimizar os possíveis problemas de instabilidade da enzima, em determinadas reações, buscando melhorar sua atuação em diversas aplicações. De uma forma geral pode-se agrupar os métodos de imobilização em: por confinamento da enzima (encapsulamento e microencapsulamento), por ligação em superfície sólida (adsorção física, covalente e iônica) e também por ligação cruzada da enzima com um material insolúvel multifuncional (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011b).

A Figura 6 apresenta um esquema dos métodos de imobilização de enzimas.

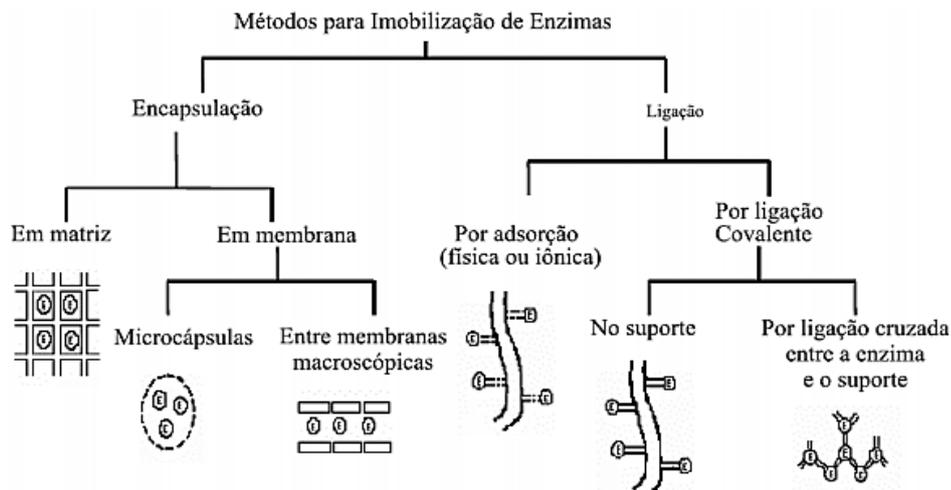


Figura 6 - Métodos de imobilização de enzimas.

Fonte: (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004, p. 624).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização é importante para se obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não são afetadas no processo, comparando-se com sua forma livre, proporcionando também a reutilização das enzimas sem causar modificações em suas estruturas (ADLERCREUTZ, 2013; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2012).

3.7.1 Imobilização por adsorção

Um dos métodos de imobilização mais utilizados, cujo procedimento é muito simples, é a imobilização de enzimas via adsorção física. O suporte sólido imobiliza a enzima por

interações hidrofóbicas ou de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou ligações iônicas. A desvantagem é a dessorção da enzima do suporte ocasionada pelas variações de temperatura, pH e força iônica. Os suportes empregados neste método devem ser selecionados considerando seu custo ao processo, sua estabilidade química e física, resistência mecânica, caráter hidrofóbico/hidrofílico, além da capacidade de adsorção de enzima. Somando-se a isso, é importante avaliar parâmetros como tamanho da enzima, área superficial do suporte, porosidade e tamanho dos poros do material adsorvente para se alcançar uma adsorção mais eficiente (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; MENDES et al., 2011c).

A técnica de adsorção é muito empregada para as lipases, pois elas apresentam um mecanismo catalítico específico, que possibilita sua fácil adsorção em superfícies hidrofóbicas, conhecido como ativação interfacial. É bem descrito na literatura, que a maioria das lipases apresenta uma tampa polipeptídica (lid) que controla o acesso ao seu sítio ativo. Assim, a lipase possui duas formas conformacionais, na *forma fechada*, ela é inativa, pois a tampa está fechada, isolando o seu sítio ativo do meio reacional; na *forma aberta*, ocorre o deslocamento da tampa, fazendo com que o sítio ativo esteja agora exposto ao meio reacional. Na presença de gotas de substratos hidrofóbicos (como óleo vegetal), a lipase expõe seu sítio ativo (*forma aberta*) e assim é fortemente adsorvida na interface destas gotas (MATEO et al., 2007).

Na presença de interfaces hidrofóbicas, neste caso de suportes hidrofóbicos, ocorre a modificação da estrutura conformacional da lipase, expondo sua superfície interna hidrofóbica, do mesmo modo que para a gota de óleo, permitindo sua adsorção no suporte, via ativação interfacial (Figura 7). Esse mecanismo de ativação interfacial é um método de baixo custo que pode ser usado como um recurso na imobilização de lipases (BASTIDA et al., 1998). No entanto, a força hidrofóbica do suporte pode influenciar negativamente na recuperação da enzima, podendo ocorrer sua inativação e assim impossibilitar sua aplicação (RUEDA et al., 2015).

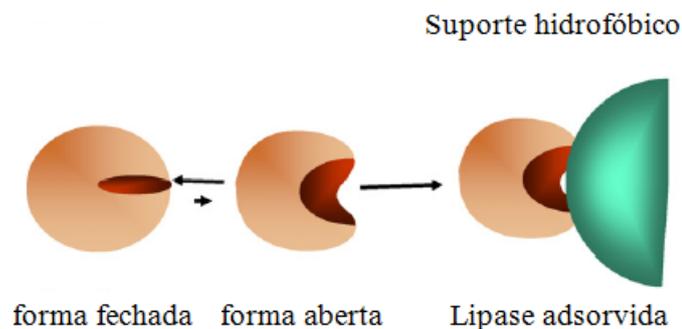


Figura 7 - Imobilização da lipase por adsorção interfacial em suporte hidrofóbico a baixa força iônica. Fonte: Adaptado de (MATEO et al., 2007).

3.7.2 Imobilização por ligação covalente

O método de imobilização por ligação covalente utiliza ligações com energia maiores que a imobilização por adsorção. Esta técnica baseia-se na modificação química de um resíduo de aminoácido a partir da ligação covalente da enzima com o suporte insolúvel em água ou pela formação de ligações cruzadas da enzima em uma matriz com grupos bifuncionais (MENDES et al., 2011b; MENDES; DE CASTRO; DE L.C. GIORDANO, 2013).

Este método pode também utilizar mecanismos que permitem agregar vantagens tanto da ligação covalente (adequada para estabilizar a enzima, evitando sua liberação ou dessorção no meio) como também da ativação interfacial, observada na imobilização por adsorção. Esta ideia baseia-se em suportes heterofuncionais ou multifuncionais, que reagem com o grupo amino primário da enzima (ADLERCREUTZ, 2013; RUEDA et al., 2015).

Um exemplo de suporte heterofuncional é a conversão de octil-agarose num suporte glioxil-octil-agarose. Para esse suporte, o processo de imobilização da lipase, ocorre primeiramente pelo mecanismo de ativação interfacial, com a adsorção da enzima na octil-agarose. Após essa etapa, o derivado é incubado em solução alcalina para que ocorra a formação de várias ligações covalentes entre os grupos aminos primários desprotonados (como os resíduos de lisina) presentes na superfície da proteína e os grupos aldeídos alifáticos (grupos glioxil) presentes na superfície do suporte (RUEDA et al., 2015).

Outro exemplo de suporte heterofuncional é a octil-agarose ativada com divinil-sulfona (DVS). A ativação com DVS pode ser alcançada em suportes que possuam uma grande variedade de grupos em sua superfície, como amino, tiol ou hidroxilas (DOS SANTOS et al., 2015a). Os grupos reativos DVS quimicamente inseridos no suporte podem reagir com os grupos amino, fenol, imidazol ou tiol das proteínas, resíduos que são frequentemente encontrados na superfície das lipases e, portanto, muito úteis para a obtenção de diferentes ligações entre a enzima e o suporte (Figura 8) (DOS SANTOS et al., 2015b).

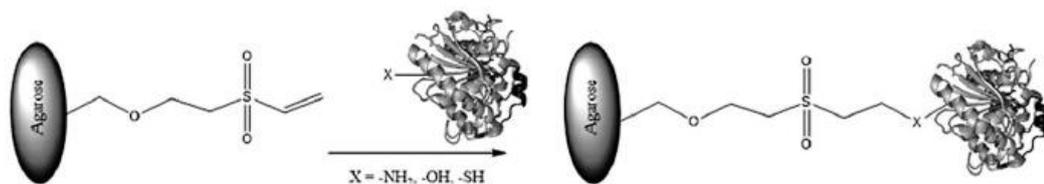


Figura 8 - Reação do suporte ativado com DVS com enzimas.

Fonte: Adaptado de (DOS SANTOS et al., 2015b).

Os suportes DVS podem ser incubados em uma vasta faixa de valores de pH, em oposição ao glioxil-agarose, que geralmente requer a incubação do suporte em valores alcalinos de pH. A ativação com DVS pode produzir ligações estáveis enzima-suporte diretamente durante a etapa de incubação, não sendo necessário nenhum tratamento adicional para estabilizar estas ligações (DOS SANTOS et al., 2015a, 2015b).

3.7.3 Tipos de suportes para imobilização de enzimas

O tipo de suporte a ser escolhido para o sistema enzima-suporte deve possibilitar a obtenção de algumas características desejáveis como boa estabilidade de fixação da enzima no suporte, alta estabilidade enzimática, baixa desnaturação ocasionada por possíveis distorções, boa resistência mecânica do suporte frente às condições do meio, e também uma elevada retenção da atividade enzimática inicial (ADLERCREUTZ, 2013; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Na literatura, são citados vários materiais que podem ser utilizados como suporte. Eles podem ser de origem orgânica ou inorgânica, sintéticos ou naturais, e algumas vezes é necessário que estes suportes tenham uma modificação ou inclusão de grupos reativos, para a ativação do mesmo, como no caso dos géis de glioxil-agarose, divinilsulfona-agarose, glioxil-amino-agarose, entre outros (ALBUQUERQUE et al., 2016; MENDES; DE CASTRO; DE L.C. GIORDANO, 2013; SILVA et al., 2014).

Outras características desejáveis que devem ser observadas na seleção de um suporte são: a área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica/hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano e ainda baixo custo (MENDES et al., 2011c; MENDES; DE CASTRO; DE L.C. GIORDANO, 2013)

Os polímeros sintéticos são considerados como bons suportes dentre os materiais utilizados na imobilização de enzimas, devido às diferentes formas físicas e estruturas químicas, e outros polímeros naturais (hidrogéis de quitosana) possuem baixo custo e são degradáveis (MENDES et al., 2011c).

3.7.3.1 Agarose

A agarose é uma mistura de moléculas de ágar com um conteúdo menor de cargas e, portanto, com maior capacidade de gelificação. É um dos suportes mais utilizados na imobilização de enzimas (MENDES et al., 2011c).

As partículas de agarose são formadas por longas cadeias, muito grandes quando comparada ao tamanho das lipases, assim pode-se considerar que a interação da lipase com a agarose ocorre como se esta fosse uma superfície plana (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008).

A agarose é muito hidrofílica, entretanto, quando revestida por cadeias de octil ou butil sua superfície se torna hidrofóbica o suficiente para permitir a imobilização de lipase pelo mecanismo de ativação interfacial (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008).

Octil agarose ativada com diferentes agentes:

As partículas de octil-agarose reticuladas possuem alguns grupos dióis (resultantes da abertura das porções epoxi durante a preparação do suporte), que podem ser facilmente oxidados em grupos glioxil por oxidação com periodato (Figura 9). Isto torna a imobilização da enzima possível por uma primeira ativação interfacial (com as vantagens que esta abordagem possui) seguido por ligação (s) covalente (s) para evitar a libertação indesejada da enzima e conferir maior estabilidade.

Quando o gel octil-agarose é submetido à oxidação por periodato de sódio, é possível reduzir 25 μmol de grupos aldeídos por grama de suporte úmido (RUEDA et al., 2015).

Os suportes glioxil foram descritos como muito adequados para se obter uma intensa ligação covalente multipontual. Esse bom resultado ocorre mesmo que a imobilização neste suporte envolva apenas os grupos amino primários da proteína. Entretanto, para que haja a formação das ligações covalentes, o suporte com a lipase precisa ser encubado em pH alcalino para favorecer a formação das ligações e, ainda, a lipase precisa ter uma boa quantidade de lisina em sua superfície (DOS SANTOS et al., 2015a; RUEDA et al., 2015).

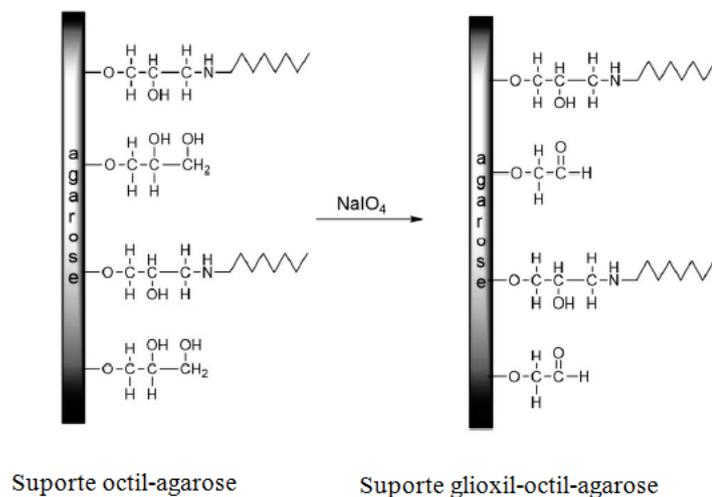


Figura 9 - Preparação do suporte glioxil-octil-agarose.

Fonte: Adaptado de (RUEDA et al., 2015).

Outro tipo de suporte heterofuncional, é a octil-agarose ativada com divinil-sulfona (DVS), para introduzir os grupos vinil-sulfona na superfície de suporte. O grupo vinil-sulfona pode ser facilmente introduzido por modificação dos grupos hidroxilo da octil-agarose com DVS, e este grupo pode reagir com grupos amino primário e secundário, imidazol, tiol, grupos fenólicos, etc. A utilização deste grupo para imobilizar proteínas foi proposto pela primeira vez por Porath, Laas e Janson (1975), mas este protocolo de ativação foi pouco aplicado. A Figura 10 mostra a ativação da agarose com divinil-sulfona.

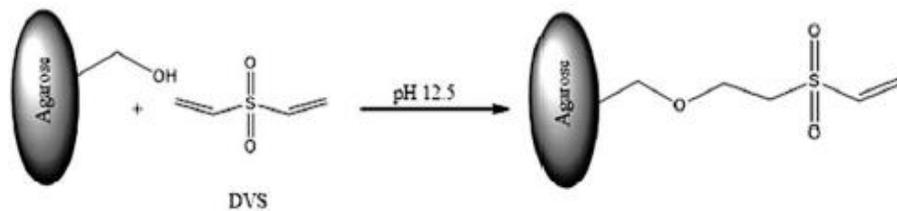


Figura 10 - Ativação da agarose com DVS.

Fonte: Adaptado de (DOS SANTOS et al., 2015b).

Recentemente, as vantagens deste grupo na imobilização enzimática têm sido estudadas (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015b). O grupo vinil-sulfona é muito estável, permitindo que a imobilização permaneça estável a longo prazo. A DVS ainda é capaz de reagir com grupos muito diferentes (grupos amino primários e secundários, grupos hidroxila, imidazol ou tiol), permitindo que esse suporte produza ligações covalentes multipontuais de uma forma rápida e intensa com a superfície da enzima.

O grupo vinil-sulfona possui uma grande vantagem em relação ao grupo-glioxil, no que tange a obtenção de ao menos uma ligação covalente: ele pode envolver muitos grupos diferentes na superfície da enzima para imobilização (Lisina, Histidina, Cistina ou Tirosina), e a ligação formada é irreversível e pode ainda ser alcançada em uma ampla faixa de valores de pH (dependendo do pKa do grupo) (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Outro suporte resultante da ativação de grupos partindo da agarose é o suporte glioxil-amino-agarose (MANAE-agarose). A Figura 11.A mostra um esquema das etapas de modificações que o suporte agarose sofreu para se atingir a formação do MANAE-agarose.

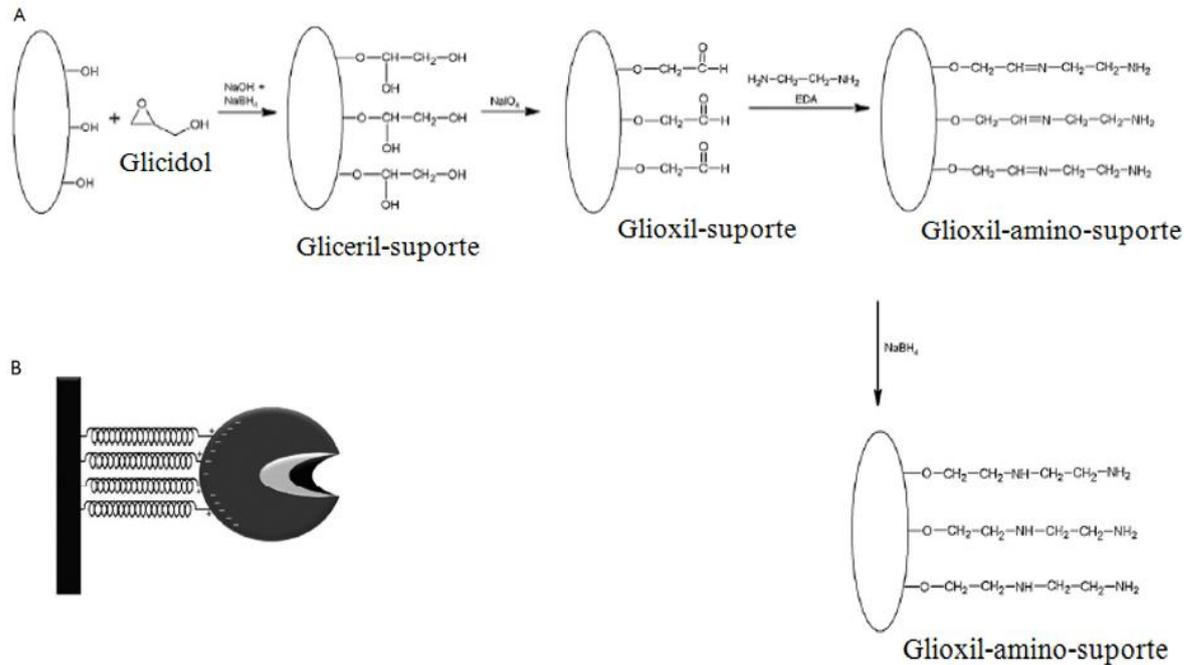


Figura 11 - A) Esquema representativo das etapas química envolvidas para a formação do suporte MANAE-agarose. B) Esquema de imobilização de uma lipase por adsorção iônica em MANAE-agarose.

Fonte: Adaptado de: A) (MENDES et al., 2011b); B) (PEREIRA et al., 2015).

A preparação deste suporte foi proposta por Fernandez-Lafuente et al. (1993). Neste trabalho os autores descreveram a preparação de novos géis de amino-agarose contendo grupos amino primários com um valor de pK muito baixo. No esquema da Figura 11.A, primeiramente, a agarose reagiu com glicidol para formação dos géis de gliceril, após essa etapa ocorreu a reação destes com periodato de sódio para a formação dos géis de glioxil-agarose. Através da reação destes géis de aldeído-agarose (glioxil-agarose) com etilenodiamina (EDA) e redução adicional com borohidreto de sódio, formou-se, finalmente, uma estrutura química resultante (MANAE-agarose), na qual os grupos amino primários estão muito próximos de uma ligação amina secundária (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993).

Esta proximidade gera uma forte repulsão entre os dois possíveis grupos amino carregados positivamente e conseqüentemente confere novas propriedades aos grupos aminos primários, como por exemplo, um menor valor de pKa. Dessa forma, é possível que ocorra um acoplamento de grupos carboxil presentes na superfície da proteína sobre estes géis aminados do suporte, usando tampão a uma baixa força iônica (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993). Ou seja, a imobilização da lipase ocorre através de adsorção iônica da enzima ao suporte, principalmente através das interações iônicas carboxílicas-aminas (Figura 11.B).

3.7.3.2 Sílica coloidal (Aerosil)

A sílica é um produto sintético, produzido pela reação de silicato de sódio e ácido sulfúrico, que ao serem misturados, resultam em uma estrutura sólida de sílica gel. Possui alta resistência mecânica, além de alta estabilidade térmica e química (DAVID et al., 2006; MORENO; SINISTERRA, 1994).

A sílica pode ser adquirida comercialmente ou também ser produzida por diferentes técnicas. O Aerosil® é uma sílica comercial pirogênica com elevada pureza, amorfa e de finíssima granulometria. Existem diferentes tipos de Aerosil® comercializados, dependendo de sua área superficial; variando de 50 m²/g a 380 m²/g, tamanho médio de partícula entre 70 Å e 400 Å e podem ser aplicados em diversos setores industriais, desde a produção de tintas e revestimentos, a resinas de poliéster insaturado, resinas de laminação e gel, borracha de silicone, adesivos e selantes, tintas de impressão, até a indústria farmacêutica e de cosméticos (DEGUSA, 1993).

Há até o momento, poucos estudos que utilizam este tipo de sílica para a imobilização de lipase, entretanto alguns estudos a aplicaram visando evitar as limitações de transferência de massa e, conseqüentemente, a melhoria do processo de difusão de substratos e produtos (CRUZ et al., 2010; KRAMER et al., 2010).

Na Figura 12 é possível verificar que partículas microporosas, como o Aerosil, inicialmente isoladas, quando ligadas por ligações de hidrogênio, originam aglomerados estáveis que podem ter centenas de nanômetros de tamanho e, deste modo, formar uma rede tridimensional (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014).

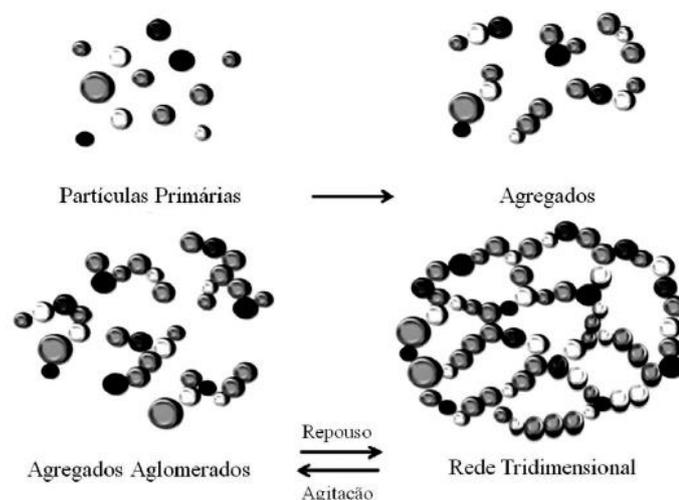


Figura 12 - Esquema representativo de formação de ponte de hidrogênio entre o Aerosil® e aglomeração para formação da rede tridimensional.

Fonte: (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014, p. 403).

3.7.3.3 Polímeros hidrofóbicos

O suporte polihidroxibutirato (PHB) é um polímero sintetizado por muitas bactérias. Apresenta alta cristalinidade e hidrofobicidade, é biodegradável e possui caráter hidrofóbico. Essas características o tornam um material apropriado para a imobilização de enzimas, incluindo a lipase (MENDES et al., 2012).

Resinas poliméricas, também foram descritas como bons suportes para a imobilização de lipases. O estireno-divinilbenzeno é uma resina adsorvente de copolímero apolar. É um adsorvente polimérico usado em cromatografia de fase reversa e possui partículas esféricas com 0,5 mm de diâmetro (ALVES et al., 2017; ALVES; CREN; MENDES, 2016; HERNANDEZ; GARCIA-GALAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). O poli-metacrilato também é uma resina apolar, com diâmetro de partícula de 25-50 mesh, descrito em literatura como suporte para imobilizar lipases (LAGE et al., 2016; TODERO et al., 2015). Lage et al. (2016) descreveu a sua aplicação como muito promissora na preparação de biocatalisadores robustos, devido às suas características tais como alta hidrofobicidade, resistência mecânica e grande área de superfície que permitiram uma elevada carga enzimática e estabilidade e ainda uma boa difusão de reagentes no microambiente do biocatalisador.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A lipase foi produzida pelo micro-organismo *G. candidum* da linhagem NRRL Y-552, obtida da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil). A linhagem foi mantida a 4°C em placas de Petri contendo ágar extrato de malte.

O suporte octil-agarose (4BCL – área superficial e diâmetro de poro de aproximadamente 5 m²/mL e 300 Å, respectivamente) foi adquirido pela GE Healthcare Life Science, sendo uma doação do Prof. Dr. Roberto Fernandez-Lafuente. O suporte polimetacrilato (PMA – área superficial e diâmetro de poro de aproximadamente 500 m²/g e 170 Å, respectivamente), comercializado como Diaion[®] HP-2MG, e o estireno-divinilbenzeno (PST-SDB - área superficial e diâmetro de poro de aproximadamente 500 m²/g e 260 Å, respectivamente), comercializado como Diaion[®] HP-20, foram adquiridos de Supelco (Bellefonte, PA, EUA), o polihidroxibutirato (PHB - área superficial e diâmetro de poro de aproximadamente 17,1 m²/g e 31 Å, respectivamente) foi comprado de PHB industrial (São Paulo, SP, Brasil), sendo estes cedidos pelo Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes. O suporte glioxil-amino-agarose (MANAE-agarose) bem como a octil-silica (área superficial em torno de 73 m²/g e diâmetro de poro aproximadamente 160 Å, com diferentes quantidades de grupos octil adicionados nas proporções de OCTES/Tolueno 1:10, 1:50 e 1:100 v/v) foram preparados e cedidos pela Profa. Dr. Jaine H. H. Luiz. Todos os demais reagentes utilizados para este trabalho foram de grau analítico.

O óleo de algodão foi adquirido da Indústria Campestre (São Bernardo do Campo, SP, Brasil), o óleo de palmiste foi adquirido pela Agropalma (Belém, PA, Brasil) e o óleo de oliva (Carbonel, Espanha) foi adquirido em mercado local.

4.1 PRODUÇÃO DA LIPASE DE *G. candidum*

A produção de lipase ocorreu por meio de fermentação submersa. As condições de cultivo para o meio de inóculo foram: 2% (m/v) de peptona de caseína, 1% (v/v) de óleo de algodão, 0,1% (m/v) de extrato de levedura e 0,05% (m/v) de MgSO₄. Para o meio de cultivo as composições dos reagentes foram: 3% (m/v) de peptona de caseína, 1,5% (v/v) de óleo de algodão, 0,1% (m/v) de extrato de levedura e 0,05% (m/v) de MgSO₄ (RAMOS et al., 2015).

O micro-organismo foi reativado em placa contendo Ágar Sabouraud dextrose (SDA) por 48 h. Uma quantidade pré-definida (diâmetro de 0,5 mm) do micro-organismo foi retirado da placa de SDA e transferido para um erlenmeyer contendo 100 mL do meio de inóculo e incubado em shaker por 24 h, a 28 °C e 250 rpm. Para a etapa de fermentação foram utilizados

10 mL de inóculo e 90 mL de meio de cultura, previamente autoclavado. A fermentação ocorreu a 28 °C e 250 rpm, por 48 h.

Após as 48 horas de fermentação, o caldo foi filtrado à vácuo utilizando-se papel filtro Whatman 41. O filtrado contendo a lipase (22,9 IU/ml) de *G. candidum* (LGC) foi utilizado para os estudos subsequentes.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA LGC BRUTA

Foram avaliados os efeitos de pH, temperatura e substrato, bem como a estabilidade térmica da LGC e seus respectivos métodos utilizados estão descritos na sequência.

4.2.1 Efeito do pH e temperatura

Para determinar a influência do pH na atividade da lipase livre e imobilizada em MANAE-agarose, variou-se o pH das soluções tampão utilizadas na hidrólise de óleos vegetais a fim de se determinar o pH ótimo. As análises foram realizadas para os óleos de oliva, de algodão e palmiste, na concentração de 50% (v/v). Os tampões utilizados foram carbonato de sódio (pH 9), fosfato de sódio (pH 6, 7 e 8) e acetato de sódio (pH 5), todos a 100 mM.

O efeito da temperatura na atividade hidrolítica da LGC livre e imobilizada foi avaliado variando-se a temperatura no intervalo de 25 a 70°C para a enzima livre e de 25 a 80°C para a lipase imobilizada. As análises foram feitas utilizando-se o óleo vegetal (oliva, palmiste ou algodão), na concentração de 50% (v/v), tampão fosfato de sódio (100 mM) e pH ótimo (8,0 para a enzima livre e 6,0 para a lipase imobilizada).

4.2.2 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos (K_m e $v_{m\acute{a}x}$) foram determinados a partir do ajuste dos dados experimentais ao modelo de Michaelis-Menten (equação 2), em que é necessário o cálculo das atividades das reações, utilizando-se a LGC livre, versus as diferentes concentrações do substrato empregado (óleos de algodão, oliva e palmiste). Foram utilizadas as concentrações de substrato de 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50% (v/v) e a análise da atividade hidrolítica foi realizada conforme descrito no tópico 4.7.1 (Determinação da atividade hidrolítica).

A partir dos parâmetros encontrados K_m , $v_{m\acute{a}x}$ e K_{cat}/K_m , utilizou-se respectivamente as equações 3, 4 e 5 para a determinação de K_{cat} , a energia livre de Gibbs requerida para a formação do complexo ES (ΔG_{E-S}^*) e a energia livre de Gibbs requerida para a liberação do produto formado (ΔG_{E-T}^*) (SALEEM et al., 2005).

4.2.3 Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos

Os testes de estabilidade térmica foram realizados em diferentes temperaturas para a enzima livre. As temperaturas fixadas para os ensaios foram de 35, 40, 45 e 50 °C. Para a lipase livre, foi adicionado 1 mL do caldo de fermentação (22,9 IU), previamente filtrado, em tubos Eppendorf e encubados (pH 6). As amostras foram coletadas em intervalos de tempo determinado e imediatamente resfriados em banho de gelo para interromper a reação de desnaturação. A atividade hidrolítica residual foi determinada pela hidrólise do óleo vegetal (LGC livre: óleos de algodão, palmiste e oliva; LGC imobilizada em MANAE-agarose: óleo de oliva) em emulsão, descrito na seção 4.7.1 (Determinação da atividade hidrolítica).

O tempo de meia vida ($t^{1/2}$), que representa o tempo após o qual a atividade enzimática decresce até 50% do valor de sua atividade inicial a uma dada temperatura, foi calculado pelo gráfico das atividades residuais versus o tempo de incubação. Os dados obtidos foram correlacionados a partir do modelo de decaimento não-linear proposto por Sadana e Henley (1987), representado pela equação 11, a qual permitiu calcular o valor da constante de desnaturação irreversível da enzima (k_d). A obtenção dos valores foi feita por meio do software Origin pro 8.0.

$$\alpha = (1 - \alpha_1) \cdot \exp(-k_d t) + \alpha_1 \quad (11)$$

em que: α é a atividade residual (razão entre atividade média e atividade inicial), α_1 é a razão entre a atividade específica inicial e final, e t é o tempo de incubação. O termo k_d descreve como ocorre a inativação do processo, e o parâmetro α descreve o nível a longo prazo da atividade.

Com a determinação de k_d para as respectivas temperaturas utilizadas no trabalho, produziu-se um gráfico pelo ajuste linear de Arrhenius, o qual permitiu calcular a energia de desnaturação térmica (E_d) para a lipase livre pela equação 12 descrita a seguir (MIRANDA et al., 2014).

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (12)$$

em que: A é o fator de frequência e R corresponde a constante universal dos gases ($8,314 \times 10^{-3}$ kJ/mol.K).

A partir do valor de E_d , determinou-se a variação de entalpia (ΔH_D^*), a variação da energia livre de Gibbs (ΔG_D^*) e a variação da entropia (ΔS_D^*) para a desnaturação térmica da

enzima, (SAQIB et al., 2010), por meio das equações 6, 7 e 8, respectivamente, descritas anteriormente no tópico 3.6 (Estabilidade térmica para a enzima).

4.3 PURIFICAÇÃO DA LGC POR PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO

Inicialmente, o caldo de fermentação, previamente filtrado, foi concentrado em Speed vac (LABCONCO CentriVap® Centrifugal Vacuum Concentrators & Cold Trap), equipamento este que permite a evaporação da água sem utilização de calor.

Em seguida, utilizou-se o método de precipitação da lipase por solvente orgânico. A escolha do solvente orgânico acetona e da proporção analisada foi baseada em dados obtidos por outros alunos do Laboratório de Bioprocessos (não publicados) e no trabalho de Ota, Sawamoto e Hasuo (2000).

Uma série de oitos ensaios preliminares, visando à maximização da atividade recuperada da lipase precipitada foi realizada, sendo utilizados dois valores distintos de concentração inicial de lipase (medida em atividade hidrolítica) de aproximadamente 350 e 1000 U; dois valores de temperatura para o solvente (acetona) (0 e 25 °C) e três relações (v/v) de solvente:caldo de fermentação, 1:1; 2:1 e 2,8:1. Após a adição da acetona, os sistemas foram agitados por três minutos em vortex e centrifugados em tubos Falcon de 50 mL por 20 minutos a 3000 rpm, para a separação das fases.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado do precipitado e da fase solvente, e a fase aquosa foi novamente colocada em contato com uma nova fase solvente (2ª etapa de precipitação). Esse procedimento se repetiu por um total de três vezes para obter a maior quantidade de enzima recuperada nesta etapa de precipitação (totalizando três etapas sucessivas de precipitação com acetona para o mesmo caldo de fermentação). O precipitado, resultante das três etapas de precipitação, foi ressuspenso em tampão fosfato (5 mM), pH 7, reunido e submetido à análise de atividade hidrolítica (tópico 4.7.1).

4.4 IMOBILIZAÇÃO DA LGC EM SUPORTES SÓLIDOS

Nessa etapa, alguns dos suportes utilizados neste trabalho foram preparados, em seguida, foram realizados ensaios preliminares para a imobilização da LGC bruta em suportes hidrofóbicos e posteriormente foram avaliadas diferentes técnicas de imobilização utilizando a LGC purificada.

4.4.1 Preparo dos suportes

Os protocolos para a modificação química do suporte octil-agarose com os grupos glioxil e divinil-sulfona, para serem obtidos os suportes OCGLX-agarose, OCDVS-agarose, MANAE-agarose e octil-sílica, encontram-se descritos abaixo:

Para a preparação do suporte OCGLX-agarose, 40 g de octil-agarose, previamente lavada com água destilada e seca em filtro de vácuo, foi colocada em contato com 160 mL de solução de periodato de sódio (10 mM) e suavemente agitada durante 3 h a 25°C, para oxidar os grupos dióis do suporte. O suporte foi filtrado e lavado com um excesso de água destilada, e depois armazenado a 4°C para utilização posterior. O periodato não consumido foi medido por titulação do filtrado com KI em bicarbonato saturado (RUEDA et al., 2015).

Para a obtenção do suporte OCDVS-agarose, preparou-se uma solução contendo 7,5 mL de divinilsulfona e 200 mL de carbonato de sódio (333 mM) a pH 12,5. Em seguida adicionou-se 10 g de octil-agarose, (previamente lavada com água destilada e seca em filtro de vácuo), e agitou-se suavemente durante 35 min a 25°C. O suporte foi filtrado e lavado com um excesso de água destilada, e depois armazenado a 4°C para utilização posterior (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Para o suporte MANAE-agarose, este foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Fernandez-Lafuente et al. (1993). A agarose foi ativada com glicidol. Para a ativação com glicidol, adicionou-se 10 g de agarose a uma solução composta de 3 mL de água destilada, 5 mL de solução de NaOH (1,7 M) contendo 0,15 g de borohidreto de sódio (NaBH₄). Em seguida, adicionou-se lentamente uma quantidade adequada de glicidol (3,6 mL) e manteve-se a mistura a 0 ° C durante 15 h. Os géis de agarose-gliceril (ativados com glicidol) foram ainda suspensos em 60 mL de água Milli-Q e 30 mL de periodato de sódio 0,1M para produzir grupos glioxil. A suspensão foi mantida sob ligeira agitação durante 2 h à temperatura ambiente. Lavaram-se os géis de glioxil com água Milli-Q e secou-se a vácuo. Adicionou-se 27 mM de etilenodiamina, com pH ajustado a 10, para 35 g de glioxil agarose sob agitação durante 2 h. Depois disso, adicionou-se 2 g de borohidreto de sódio e manteve-se nas mesmas condições. O passo final foi lavar o gel com 1 L de tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 4,0 e 1 L de solução de borato de sódio 100 mM, pH 9,0.

Para o suporte Octil-sílica, as partículas de sílica foram tratadas com solução de HCl (0,1 mol/L), seguido por lavagem exaustiva com água destilada e secas em estufa a 80°C por 24 h. Grupos octílicos foram incorporados à superfície do suporte (figura 1), conforme metodologia descrita por Tani e Suzuki (1996). Uma suspensão contendo 1 g de sílica e 20 mL

de uma mistura OCTES/Tolueno (1:10; 1:50 e 1:100 v/v) foram mantidos em refluxo por 4 h a 110°C. Os suportes ativados foram lavados com etanol, acetona e água destilada e secados a 40°C por 24 h em estufa.

4.4.2 Ensaio preliminares para a imobilização da LGC

O volume de caldo de fermentação contendo a lipase produzida variou de 5 a 110 mL de acordo com a quantidade de atividade inicial oferecida (aproximadamente 150, 750 e 2450 U), sendo previamente filtrado para a retirada das células, e foi inicialmente adicionado a 1 g de suporte (octil-agarose; octil-sílica nas proporções de grupos octil 1:10, 1:50 e 1:100). Essa suspensão foi mantida em agitação (200 rpm) em shaker orbital, a temperatura ambiente por 12 h (tempo necessário para que seja atingido o equilíbrio por adsorção, em todos os ensaios). Após as 12 h de imobilização, o derivado foi filtrado e lavado com água destilada e estocado a 4°C para posterior utilização. A imobilização foi seguida por medição da atividade resultante no sobrenadante e nos derivados pelo método de hidrólise, utilizando óleo de oliva (ver item 4.7.1) a pH 7 (100 mM).

4.4.3 Imobilização da LGC em diferentes suportes

A lipase previamente purificada e ressuspendida em tampão fosfato (5 mM), pH 7, foi imobilizada em diferentes suportes por distintos métodos de imobilização. Nesses experimentos foi utilizado 1 mg de proteína/g de suporte, que corresponde, aproximadamente, uma atividade de 229 U, e a imobilização correu por 12 h à temperatura ambiente. O baixo carregamento foi adotado para se evitar problemas difusionais.

Os suportes octil-agarose, MANAE-agarose, OCGLX-agarose, OCDVS-agarose, sílica coloidal (SA) foram diretamente colocados em contato para imobilização com a solução contendo a lipase. Para os suportes poliméricos, polihidroxibutirato PHB, poli-metacrilato (PMA) e estireno-divinilbenzeno (PST-SDB), uma etapa anterior à imobilização foi requerida, visando a retirada do ar dos poros do suporte e o seu preenchimento com água. Para estes, inicialmente, o suporte (1 g) foi incubado em 10 mL de etanol (95%, m/m) e agitado suavemente por 30 min. Em seguida foram cuidadosamente lavados com água destilada para a remoção da solução de etanol. Somente após essa etapa é que os mesmos foram incubados em suave agitação, com a solução de lipase para a imobilização da mesma, por 12 h e a temperatura ambiente.

Os suportes OCGLX-agarose e OCDVS-agarose exigem uma etapa adicional após a imobilização da lipase para que as ligações covalentes possam ser formadas (grupos amino primário da lipase com grupos aldeídos alifáticos do suporte OCGLX-agarose; grupos amino primário e secundário, imidazol, tiol e hidroxila presentes na superfície da lipase com o grupo DVS do suporte OCDVS-agarose).

Assim, as partículas de OCGLX-agarose, após a imobilização foram lavadas e ressuspensas em tampão carbonato 50 mM (pH 10) na proporção de 1 g do biocatalisador para 10 mL de tampão carbonato, e agitado durante 4 h a 25 °C. Ao final do tempo, adicionou-se borohidreto de sódio sólido a uma concentração de 1 mg / mL e agitou-se suavemente durante 30 minutos em banho de gelo. O biocatalisador foi filtrado e lavado cuidadosamente com água destilada, para a remoção do borohidreto e então foi realizada a análise de atividade para o derivado.

No caso do OCDVS-agarose, a enzima imobilizada foi filtrada e ressuspensa em tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 8) e colocada sob agitação suave durante 24 h a 25 °C, para a formação das ligações covalentes. Após esse tempo o biocatalisador foi lavado e filtrado com água destilada. A análise de atividade para o derivado foi então realizada.

4.4.4 Parâmetros de imobilização

A atividade oferecida inicial (AO) para a enzima livre foi calculada pela equação 13:

$$AO = V \times HA_i \quad (13)$$

em que V é o volume utilizado da LGC livre em solução e AH_i a atividade hidrolítica da lipase livre.

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado pela equação 14:

$$RI(\%) = \frac{Ct_0 - Ct_a}{Ct_0} \times 100 \quad (14)$$

em que a unidade de atividade hidrolítica do sobrenadante antes da imobilização é representada por Ct₀ e após a imobilização por Ct_a.

A atividade desaparecida (AD) foi determinada pela diferença entre Ct₀ e Ct_a (equação 15).

$$AD = Ct_0 - Ct_a \quad (15)$$

Por fim, a atividade recuperada (AR), que representa a porcentagem de atividade hidrolítica avaliada para o derivado em razão da atividade desaparecida, foi determinada de acordo com a equação 16.

$$AR(\%) = \frac{AH}{AD} \times 100 \quad (16)$$

em que AH é a atividade hidrolítica do derivado e AD é a atividade desaparecida (RAMOS et al., 2015).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA LGC IMOBILIZADA EM MANAE-AGAROSE

A metodologia para avaliação dos efeitos de pH, temperatura, e análises das propriedades catalíticas da LGC imobilizada no suporte MANAE-agarose estão descritas a seguir.

4.5.1 Efeito do pH e do carregamento de proteína

O efeito do pH, na imobilização da lipase purificada, no suporte MANAE-agarose foi verificado para uma faixa de pH de 4 a 8 e baixa força iônica (5 mM). Nesses ensaios foi utilizado um baixo carregamento (1 mg de enzima/g de suporte), e a imobilização ocorreu por 12 h a temperatura ambiente, e sob agitação de 170 rpm.

O efeito da quantidade de proteína imobilizada nos parâmetros de imobilização também foi verificado. A lipase purificada foi imobilizada em diferentes carregamentos de 1 a 8,5 mg/g de suporte MANAE-agarose. Os ensaios foram realizados a 25°C e foi utilizado o tampão fosfato para pH 7 (5 mM) ao longo de 12 h, 170 rpm.

4.5.2 Parâmetros cinéticos

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos da LGC imobilizada em MANAE-agarose foi utilizado o mesmo procedimento para a LGC livre, conforme descrito no tópico (4.2.2). No entanto, para o cálculo das atividades hidrolíticas foi utilizado apenas o óleo de oliva.

4.5.3 Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos

Os testes de estabilidade térmica para a LGC imobilizada em MANAE-agarose e o cálculo dos parâmetros termodinâmicos seguiu o mesmo procedimento utilizado para a LGC livre, descrito no tópico (4.2.3). No entanto, para este caso foram adicionados 0,1 g de derivado em 1 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 6,0), colocados em tubos Eppendorf e encubados. A

atividade hidrolítica foi determinada pela hidrólise do óleo de oliva em emulsão, descrito na seção 4.7.1 (Determinação da atividade hidrolítica).

4.6 APLICAÇÃO DA LGC LIVRE E IMOBILIZADA

A LGC foi aplicada na hidrólise de óleos vegetais para produção de ácidos graxos concentrados e a metodologia para os ensaios de hidrólise e testes de reciclo estão descritos nos tópicos a seguir.

4.6.1 Hidrólise de óleos vegetais

A reação de hidrólise do óleo de oliva foi realizada em reator de vidro encamisado de 150 mL contendo 60 g de meio reacional, sob pressão atmosférica por um período máximo de 3 h. A mistura foi agitada com um agitador mecânico a uma velocidade constante de 1000 rpm (Figura 13). Para a enzima livre utilizou-se 15 g de óleo de oliva, 30 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 8), ou apenas água destilada, 15 mL de caldo de fermentação contendo a enzima livre (308 U), e temperatura de 37 °C. Para a enzima imobilizada em MANAE-agarose foi utilizado a mesma quantidade de óleo vegetal, 45 mL de tampão fosfato 5 mM (pH 6), 3,8 g de derivado (8,5 mg de enzima/g de suporte, que correspondem a 308 U), e temperatura de 45 °C. Todas as reações foram realizadas em duplicata.



Figura 13 - Biorreator agitado mecanicamente.

Fonte: do Autor.

As amostras foram periodicamente removidas do reator e transferidas para frascos contendo 10 mL de uma mistura (1:1) de etanol e acetona para desnaturar a enzima, interrompendo assim a reação. Adicionou-se indicador de fenolftaleína e a mistura foi titulada com uma solução padronizada de 20 mM de hidróxido de sódio. O grau de hidrólise foi definido como a percentagem presente (em massa) de ácidos graxos livres na amostra dividida pela

quantidade teórica máxima e calculada utilizando a equação 17 (ROONEY; WEATHERLEY, 2001).

$$\text{Hidrolise(\%)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times 10^{-3} \times M_{\text{NaOH}} \times MM}{A \times f} \times 100 \quad (17)$$

em que: V é o volume de solução de hidróxido de sódio (mL) necessário durante a titulação; M é a concentração de NaOH (20 mM); MM é a massa molecular média de ácidos graxos para cada óleo vegetal em g/mol (ver Tabela 1) (Apêndice A); A é a massa da amostra (g) e f é a fração de óleo no início da reação.

4.6.2 Testes de reciclo para o derivado MANAE-agarose

A hidrólise do óleo de oliva foi realizada a 45°C em reator de vidro encamisado, pressão ambiente e agitação mecânica de 1000 rpm. O sistema de 60 g manteve a mesma composição descrita no item anterior: 15 g de óleo de oliva; 45 mL de tampão fosfato (5 mM) pH 6, 3,8 g de derivado (8,5 mg de proteína/g de suporte). Ao final de cada ciclo de hidrólise (3 ciclos consecutivos), o biocatalisador foi retirado do meio reacional, lavado com água destilada em abundância, para a remoção das moléculas dos reagentes e/ou dos produtos de seu microambiente e filtrado à vácuo. Após essas etapas, o biocatalisador foi introduzido em um novo meio reacional.

4.7 ENSAIOS ANALÍTICOS

A seguir, está descrita a metodologia utilizada neste trabalho para a determinação da atividade hidrolítica, assim como a determinação de proteínas e do peso molecular da enzima.

4.7.1 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica da enzima livre foi determinada pela hidrólise de um óleo vegetal em emulsão (de oliva, de algodão ou de palmiste), pelo método adaptado de Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela mistura de 50 mL de óleo vegetal com 50 mL de solução de goma arábica à 7% (m/v) como agente tensoativo.

A mistura reacional continha 5 mL de emulsão, 4 mL de tampão fosfato de sódio pH 7 (100mM) e 1 mL de caldo de fermentação (22,9 IU), filtrado, contendo a lipase livre, ou 5mL de tampão e 0,1 g (22,9 IU) para a lipase imobilizada. A mistura foi incubada por 5 minutos, a

uma temperatura de 37 °C e sob condições de agitação de 200 rpm em um agitador rotacional. A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de álcool/acetona na proporção de 1:1. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de hidróxido de sódio (20 mM) com a presença de fenolftaleína como indicador. O branco da reação foi realizado adicionando-se 1 mL do meio de cultivo autoclavado utilizado para a fermentação, ou 0,1 g do suporte empregado para a imobilização.

Uma unidade internacional de atividade hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de ácido graxo livre por minuto sob as condições experimentais descritas acima. A equação 10 a seguir descreve a expressão para o cálculo da atividade hidrolítica da enzima em estudo.

$$A = \frac{(V_A - V_C) \cdot M_{NaOH} \cdot 10^3}{mL(amostra) \cdot t(reação)} \quad (10)$$

em que: V_A é o volume titulado para a reação com 1 mL de amostra de LGC ou 0,1 g de derivado; V_C é o volume de controle; M_{NaOH} é a molaridade da solução de hidróxido de sódio (NaOH) para a titulação; e t é o tempo de reação.

4.7.2 Análise de eletroforese (SDS-PAGE)

A análise de SDS-PAGE foi realizada em um Kit Mini-Protean II Dual-Slab Cell (Bio-Rad, USA), de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). As análises foram realizadas utilizando gel de poliacrilamida 12%, e os géis foram revelados com Coomassie Brilliant Blue R-250. Foram utilizados como padrão seis marcadores moleculares na faixa de 14,4 a 97,4 kDa (Bio-Rad, USA) que correspondem as bandas observadas de lisozima, tripsina inibidora, anidrase carbonica, ovalbumina, BSA (albumina sérica bovina), e fosforilase.

4.7.3 Análise para determinação de proteína

A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) e foi utilizado como padrão a proteína BSA (albumina sérica bovina).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão divididos em ensaios de imobilização, caracterização de propriedades catalíticas, avaliação de estabilidade térmica e aplicação em reações de hidrólise para a LGC, e a discussão dos mesmos está descrita de acordo com o tópico correspondente.

5.1 ENSAIOS PRELIMINARES PARA IMOBILIZAÇÃO DA LGC PRODUZIDA SEM PURIFICAÇÃO

A imobilização de lipases via ativação interfacial em suportes hidrofóbicos em baixa força iônica vem sendo reportada como um método muito simples e eficiente de imobilizar e purificar lipases provenientes de caldos de fermentação (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; BRABCOVÁ et al., 2013; RAMOS et al., 2015). Por esse motivo, dois suportes hidrofóbicos foram avaliados em ensaios preliminares para se verificar a capacidade dos mesmos em imobilizar e purificar a lipase produzida, diretamente do caldo de fermentação.

Nesta etapa foram utilizados os suportes octil-agarose e octil-silica, (este último com diferentes quantidades de grupos octil adicionados nas proporções de 1:10, 1:50 e 1:100) e comparados com os resultados obtidos por Ramos et al. (2015) para a imobilização da mesma enzima em polihidroxibutirato (PHB) (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros de imobilização obtidos para a LGC em diferentes carregamentos oferecidos, utilizando a enzima produzida sem a etapa de purificação.

Derivados	AO (U)	AD (U)	RI (%)	AH (U/g derivado)	AR (%)
PHB*	114,6	109,5 ± 0,0	95,5	21,5 ± 0,3	19,6
Octil-agarose	169,2	62,5 ± 0,0	49,4	12,1 ± 0,2	19,3
PHB*	687,4	583,1 ± 1,0	84,8	186,4 ± 3,9	31,9
Octil-agarose	755,4	343,2 ± 0,1	45,4	98,7 ± 1,1	28,8
Octil-sílica 1:10	755,4	99,1 ± 0,1	13,12	19,1 ± 0,2	19,3
Octil-sílica 1:50	755,4	116,1 ± 0,0	15,37	14,6 ± 0,7	12,6
Octil-sílica 1:100	755,4	181,6 ± 0,0	24,04	12,8 ± 0,1	7,1
PHB*	2406,0	1066,4 ± 2,8	44,30	393,7 ± 1,0	36,9
Octil-agarose	2488,3	593,28 ± 1,4	23,84	35,9 ± 1,2	6,1

(*) dados para o PHB obtidos por Ramos et al. (2015).

AO = Atividade oferecida; AD = atividade desaparecida; RI = Rendimento de imobilização; AH = Atividade hidrolítica; AR = Atividade recuperada.

Fonte: do Autor.

Para um baixo carregamento observou-se que o PHB imobilizou 95,5 % da atividade oferecida, enquanto que para o octil-agarose foi imobilizado cerca de 50 %. Entretanto, para o PHB a atividade recuperada foi de apenas cerca de 20 %, o que pode estar relacionado à distorção que a enzima sofria quando adsorvida em baixo carregamento no suporte, levando a perda parcial de sua atividade (RAMOS et al., 2015). O mesmo comportamento foi observado para a octil-agarose (AR = 19,3 %).

Para a quantidade de atividade oferecida de 755 U, observou-se que, novamente, o melhor rendimento de imobilização para a lipase não purificada foi obtido pelo PHB (≈ 85 %); cerca de duas vezes maior do que o observado para a octil-agarose. Nesse ensaio, entretanto, a atividade recuperada do derivado octil-agarose (28,8 %) apresentou um valor próximo ao obtido para o PHB (31,9 %). Ramos et al., (2015) observaram que, para o PHB, o aumento das cargas de extrato enzimático bruto oferecidas permite maior rendimento de imobilização. No entanto, um aumento maior de quantidade de enzimas oferecidas diminui o rendimento de imobilização devido à saturação do suporte. Para o suporte PHB, a enzima é imobilizada na parte externa devido ao diâmetro de poro (31 Å) ser menor que o diâmetro molecular da LGC (69,5 Å), e para o octil-agarose a imobilização pode ocorrer na superfície interna do suporte (diâmetro de poro ≈ 300 Å). Porém, o PHB possui maior área superficial, podendo imobilizar maior quantidade de enzima comparado com o octil-agarose.

Para um alto carregamento (2400 U $\approx 10,5$ mg de proteína), o rendimento de imobilização para o PHB também foi o dobro do valor observado para a octil-agarose, possivelmente devido à área superficial do PHB ser maior (cerca de 3 vezes), entretanto, a atividade do derivado octil-agarose (6,1 %) ficou muito abaixo do valor obtido para o PHB (36,9 %). Uma possível explicação para essa baixa atividade recuperada pode ser a saturação do suporte e possíveis problemas causados pela limitação difusional intrapartícula (limitação de transferência de massa do substrato ao sítio ativo da lipase imobilizada) (Ramos et al., 2015). Outras lipases como *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica*, imobilizadas em suporte octil-agarose (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017), atingiram a saturação do suporte para um carregamento inferior a 10 mg de enzima por grama de suporte, o que coincide com o carregamento de LGC utilizado nesse ensaio.

Acredita-se que na etapa de imobilização, as impurezas presentes no caldo de fermentação tenham interferido de uma forma mais incisiva no processo de adsorção da lipase no suporte octil-agarose comparado com o PHB.

No caso das sílicas modificadas com octil em diferentes proporções, os resultados mostraram um aumento no rendimento de imobilização conforme se aumentou a proporção dos grupos octil na sílica, aumentando assim seu grau de hidrofobicidade, porém a atividade recuperada diminuiu, provavelmente devido à distorção da lipase imobilizada. Para estes suportes, tanto o rendimento de imobilização como a atividade recuperada foram inferiores em relação aos obtidos pelo PHB e pela octil-agarose para uma atividade oferecida aproximada.

Pelos resultados obtidos, foi possível observar que os suportes octil-agarose e octil-sílica não foram capazes de realizar a purificação da enzima diretamente do caldo de fermentação tão eficientemente quanto o PHB. Dessa forma, optou-se pela purificação da lipase produzida para o prosseguimento deste trabalho. Assim, a lipase produzida seguiu um protocolo de purificação via precipitação por solvente orgânico, para que a imobilização em diferentes tipos de suporte e por distintos métodos de imobilização pudesse ser corretamente avaliada, sem a interferência dos contaminantes presentes no caldo de fermentação.

5.2 PURIFICAÇÃO DA LGC POR PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO

A purificação de proteínas por precipitação por solventes orgânicos é uma técnica simples e barata. Entretanto, é preciso controlar alguns parâmetros operacionais, como temperatura, quantidade de solvente, concentração inicial da lipase, entre outros, para que a enzima possa ser recuperada com a maior atividade possível (JANSON, 2011)

Dessa forma, para o estabelecimento desse protocolo de purificação, ensaios preliminares visando à maximização da atividade recuperada da enzima precipitada foram realizados, variando-se a concentração inicial de lipase (medida em atividade hidrolítica), a temperatura do solvente (acetona) e a relação da quantidade de solvente para o caldo de fermentação (proporção solvente-caldo de fermentação).

Na Tabela 3 encontram-se as variáveis avaliadas e os resultados obtidos. Os valores de atividade recuperada mostrados na Tabela 3 referem-se aos valores globais do processo de precipitação (soma final das três etapas de purificação empregadas separadamente).

Em relação à temperatura, o melhor resultado para a atividade recuperada (87,9 %) foi obtido para o ensaio no qual foi usado o solvente gelado (0°C) e uma concentração de enzima com atividade inicial de aproximadamente 850 U/mL. Também foi verificado que para o ensaio no qual foi usando o solvente a temperatura ambiente e uma baixa concentração de enzima, não houve a precipitação da lipase. É bem conhecido que a precipitação de proteínas por solventes orgânicos depende muito da temperatura. Os solventes orgânicos, quando utilizados a baixas temperaturas, são bastante úteis na precipitação de proteínas. Em temperaturas mais elevadas

esses solventes podem levar à desnaturação por rompimento das ligações de hidrogênio e estabelecimento de interações apolares, importantes na manutenção da conformação proteica (JANSON, 2011).

Tabela 3 - Variáveis avaliadas (temperatura, atividade inicial e proporção solvente:caldo) para a precipitação da LGC e atividade recuperada.

Atividades iniciais (U/mL)	Proporção solvente:caldo	Temperatura do solvente (°C)	Atividade recuperada (%)
344,0	1:1	0	32,5
921,6	1:1	0	19,9
328,1	2:1	0	40,2
844,4	2:1	0	87,9
350,1	2,8:1	0	10,3
1029,0	2,8:1	0	18,0
329,3	2:1	25	-*
943,7	2:1	25	16,2

* Não foi observada a precipitação da enzima.

Fonte: do Autor.

A proporção de solvente adicionado também foi um fator que interferiu na atividade recuperada. Para a proporção (1:1) observou-se que uma maior recuperação da atividade foi obtida para a menor concentração inicial da enzima. Para a maior concentração, acredita-se que a quantidade de solvente utilizado não tenha sido suficiente para promover uma maior interação proteína-proteína (do que a interação água-proteína) e assim precipitar a lipase presente no caldo de fermentação. Entretanto, quando se aumentou a proporção de solvente adicionado (2:1) verificou-se uma maior atividade recuperada para ambas as concentrações utilizadas. Ota, Sawamoto e Hasuo (2000) estabeleceram em seu trabalho a mesma proporção de 2:1 de acetona: caldo de fermentação para a purificação de uma lipase produzida por *Geotrichum sp.* FO401B.

Para a maior proporção de solvente adicionado verificou-se uma queda na atividade recuperada para a lipase precipitada, provavelmente devido a uma maior desnaturação da proteína.

A Figura 14 mostra a análise de eletroforese realizada para o caldo de fermentação e para as três etapas de precipitação subsequentes para a LGC.

Observou-se, que conforme relatado por Ramos et al. (2015) a utilização de um meio de fermentação sintético, propiciou a produção pelo micro-organismos de apenas uma única proteína que corresponde a lipase de massa molecular aparente de 65 kDa, diminuindo dessa forma a complexidade da etapa de purificação subsequente.

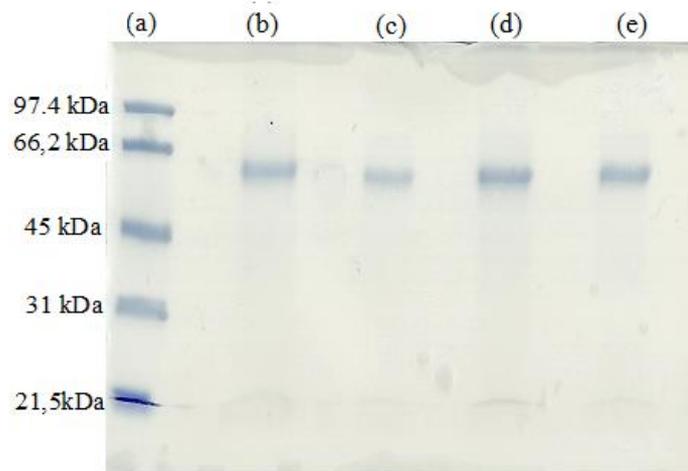


Figura 14 - SDS-PAGE para a LGC: a) Marcadores moleculares; b) caldo de fermentação; c) primeira etapa de precipitação; d) segunda etapa de precipitação; e) terceira etapa de precipitação.

Fonte: do Autor.

Na etapa de precipitação por solvente orgânico (Figura 14 (c); (d); e (e); - que correspondem às três precipitações realizadas em sequência), observou-se novamente que somente a lipase produzida foi precipitada.

Dessa forma estabeleceu-se as condições para a purificação da lipase produzida, que foram empregadas na continuidade deste trabalho, a saber: temperatura (0 °C), proporção de solvente (2:1) e quantidade de lipase inicial (≈ 900 U/mL), para uma recuperação em torno de 90% da atividade inicial (≈ 810 U/mL).

5.3 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE PURIFICADA POR DIFERENTES PROTOCOLOS

A purificação da lipase foi muito importante para a eliminação das impurezas e contaminantes que interferiram negativamente no processo de imobilização da lipase para o suporte octil-agarose (ver Tabela 2). A comprovação disso pode ser evidenciada comparando-se o rendimento de imobilização para os ensaios com e sem purificação prévia da enzima (em baixo carregamento). Quando a lipase foi purificada, obteve-se aproximadamente 90 % de rendimento de imobilização com octil-agarose, enquanto que sem a purificação foi verificado apenas cerca de 50 %.

Dando prosseguimento ao trabalho, foram utilizados vários suportes e diferentes protocolos de imobilização para a lipase produzida e purificada de *G. candidum*, visando à obtenção de biocatalisadores ativos para posterior aplicação na produção de ácidos graxos

concentrados. Os parâmetros de imobilização e a atividade hidrolítica dos derivados são resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros de imobilização e atividade hidrolítica da LGC purificada e imobilizada em diferentes de suportes e distintos protocolos de imobilização a 25 °C (1 mg de proteína/ g de suporte).

Derivados	RI (%)	AH (U/g de suporte)	AR (%)
SA	100	8,6 ± 0,3	3,8
PHB	100	12,6 ± 0,2	5,6
PST-DVB	100	12,2 ± 0,0	5,5
PMA	100	4,5 ± 0,1	2,0
Octil-agarose	91,5	7,9 ± 0,2	3,8
MANAE-agarose	88,8	45,4 ± 0,2	22,8
OCDVS-agarose	100	0,0 ± 0,0	0,0
OCGLX-agarose	100	7,2 ± 0,4	3,2

RI = Rendimento de imobilização; AH = Atividade hidrolítica; AR = Atividade recuperada.

Fonte: do Autor.

Para os suportes PHB, PST-DVB e PMA a imobilização da lipase purificada ocorreu por adsorção física via ativação interfacial, na qual a lipase provavelmente se ligou ao suporte pela exposição do seu centro ativo (BASTIDA et al., 1998). Para o suporte MANAE-agarose a imobilização ocorreu via adsorção iônica, em pH levemente ácido (pH 6), permitindo a formação de interações iônicas entre os grupos carboxilatos presentes na superfície da enzima e os grupos amino primário protonados (pKa = 6,8) presentes no suporte (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993). Para o suporte de sílica (Aerosil – SA), houve a imobilização por adsorção física, uma vez que na superfície da sílica-gel observa-se a presença de grupos silanóis, os quais formam ligações de hidrogênio diretamente com os grupamentos de ligação da enzima (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014). Para os suportes OCDVS-agarose e OCGLX-agarose o processo de imobilização ocorreu em duas etapas, primeiro houve a imobilização via ativação interfacial da lipase no suporte e posteriormente o derivado obtido foi incubado para promover a formação de ligações covalentes multipontuais (SANTOS et al., 2015; RUEDA et al., 2015).

Todos os suportes testados exibiram um rendimento de imobilização elevado variando de 88,8 a 100%. Entretanto, foi observado um baixo rendimento de imobilização para os suportes hidrofóbicos, o que pode estar relacionado à forte distorção da enzima por imobilização via adsorção física (PHB, PST-DVB, PMA e octil-agarose). Neste tipo de imobilização as moléculas de lipase são orientadas para superfícies do suporte (mecanismo de ativação interfacial em suportes hidrofóbicos) o que pode promover uma forte distorção da

lipase, e resultar em uma baixa acessibilidade das gotículas de óleos ao sítio ativo da enzima por impedimento estérico. Por outro lado, a máxima atividade hidrolítica ($45,4 \pm 0,2$ U/ g de biocatalisador) e a maior porcentagem de atividade recuperada (22,8 %) foram observadas para a imobilização de LGC por adsorção iônica em MANAE-agarose. Neste protocolo de imobilização os grupos carboxilato, presentes na superfície LGC, estão preferencialmente localizados no lado oposto do sítio ativo (superfície hidrofóbica), e assim a ligação iônica entre eles e os grupos amino protonados do suporte, permite uma boa orientação do sítio ativo de LGC facilitando a acessibilidade das moléculas do substrato (PEREIRA et al., 2015).

Para o suporte hidrofílico SA (sílica – Aerosil), a formação de agregados e até de estruturas tridimensionais entre as partículas do próprio suporte (Aerosil), pode proporcionar uma limitação difusional do substrato ao sítio catalítico da LGC imobilizada, e possivelmente resultar em uma baixa atividade recuperada.

Os biocatalisadores preparados por adsorção física sequencial e ligação covalente utilizando OCGLX-agarose e OCDVS-agarose exibiram baixa atividade catalítica, sendo que para o último ocorreu a inativação completa da enzima. O reagente de ativação do suporte, divinilsulfona, é capaz de reagir com os grupos amino primários e secundários, assim como os grupos hidroxila, fenil, tiol e imidazol, presentes na superfície da enzima e do suporte (SANTOS et al., 2015). Dessa forma a possível inativação da LGC pode ser atribuída à distorção de sua estrutura tridimensional resultado da má orientação da lipase sobre a superfície de suporte, uma vez que, muitas ligações covalentes podem ser construídas ao mesmo tempo, devido à grande quantidade de grupos que o reagente de ativação pode interagir.

Para o suporte OCGLX-agarose, a necessidade de incubação em meio alcalino (pH 10) pode ter inativado a LGC, uma vez que a enzima livre é instável a pH maiores que 8,5 (RAMOS et al., 2015). Entretanto, como foi utilizada uma baixa carga de lipase, levantou-se a possibilidade de inativação da enzima ser decorrente de sua distorção na primeira etapa que é a adsorção em octil-agarose, pois os valores encontrados para o derivado obtido para o OCGLX-agarose ($7,2 \pm 0,4$ U/g) estavam próximos aos valores obtidos para a octil-agarose ($7,9 \pm 0,2$ U/g). Assim, um novo ensaio de imobilização para o OCGLX-agarose foi realizado, sendo oferecida uma carga de 4,5 mg de proteína/g de suporte, pois na imobilização por ativação interfacial em PHB, verificou-se que a LGC tendia a se distorcer e perder atividade para baixo carregamento, mas à medida que o carregamento aumentava o efeito da distorção diminuía (RAMOS et al., 2015).

Neste novo ensaio foi obtido 76,6 % de rendimento de imobilização, mas uma atividade hidrolítica de apenas $7,0 \pm 0,4$ U/g de suporte. Dessa forma, verificou-se que no caso do

OCGLX-agarose a perda da atividade da lipase ocorre na etapa de incubação a pH 10, e não na etapa anterior de adsorção no suporte, via ativação interfacial.

Com base nestes resultados, verificou-se que a adsorção iônica de LGC em MANAE-agarose foi uma estratégia promissora na preparação de um biocatalisador ativo, justificando a escolha deste suporte para a continuidade dos experimentos.

5.3.1 Influência do pH na imobilização da LGC em MANAE-agarose

O pH se caracteriza pelo equilíbrio entre íons H^+ e OH^- de uma solução e sua mudança afeta o equilíbrio de ionização de grupos ácidos e básicos de uma proteína. Assim, mudanças no valor do pH vão afetar a distribuição de cargas da proteína estudada e no caso também da superfície do suporte MANAE-agarose, e conseqüentemente, as interações eletrostáticas entre grupos da proteína e do suporte (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993; PEREIRA et al., 2015). Dessa forma a influência do pH na adsorção iônica da LGC purificada no suporte MANE-agarose foram avaliadas. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5.

Foi possível observar que quando foi utilizado o pH 4, que corresponde a proximidade do ponto isoelétrico da LGC - pH 4,3 relatado por Tsujisaka, Iwai e Tominaga (1972) - houve uma menor imobilização de proteína no suporte MANAE-agarose. Como a enzima está inserida no meio com um valor de pH 4, que é muito próximo ao seu ponto isoelétrico, a carga global na superfície da enzima tende a ser nula. Para este valor de pH a superfície do suporte MANAE-agarose (microambiente) está carregada positivamente e, assim, para que houvesse uma boa imobilização por ligação iônica seria necessário que a superfície da enzima (microambiente) estivesse com um maior número de cargas negativas possíveis, justificando dessa forma o resultado obtido de uma menor quantidade de proteína confinada no material para o pH 4.

Tabela 5 - Influencia do pH na imobilização da LGC purificada em MANAE-agarose a 25 °C, usando tampão fosfato de potássio (5mM) e carregamento de 1 mg de proteína/g de suporte.

pH	RI (%)	PI (mg/g de suporte)	AH (U/g de suporte)	AR (%)
4	77,0 ± 0,2	0,79 ± 0,2	31,3 ± 0,3	18,4 ± 0,5
5	100 ± 1,0	1,02 ± 0,1	44,5 ± 1,0	21,9 ± 0,5
6	100 ± 1,2	1,02 ± 0,1	43,5 ± 0,5	19,0 ± 0,2
7	97,6 ± 1,4	0,99 ± 0,2	45,4 ± 0,2	22,3 ± 0,4
8	100 ± 2,4	1,02 ± 0,1	44,3 ± 2,3	20,1 ± 0,4

RI = Rendimento de imobilização; PI = Concentração de proteína imobilizada; AH = Atividade hidrolítica; AR = Atividade recuperada.

Fonte: do Autor.

À medida que ocorre o aumento do pH ocorre também a desprotonação dos grupos presentes na superfície da enzima, e assim a carga global dessa superfície vai se tornando mais negativa e conseqüentemente observa-se um favorecimento da imobilização por adsorção iônica com o suporte, como pode ser observado para os valores de pH de 5 a 8 na Tabela 5.

A máxima atividade recuperada ($22,3 \pm 0,4$ %) e também a máxima atividade hidrolítica ($45,4 \pm 1,2$ U/g) foram observadas para o pH 7,0 no qual a imobilização de proteína foi de aproximadamente 100 %. Por esse motivo o pH 7,0 foi adotado nos ensaios para se avaliar o efeito do carregamento de proteínas no suporte.

5.3.2 Influência do carregamento de proteína na imobilização da LGC em MANAE-agarose

Uma elevada carga enzimática (máxima) no suporte é muito desejável e atraente do ponto de vista industrial, pois permite que o reator opere com uma atividade catalítica elevada por volume e assim a reação ocorra mais rapidamente. Entretanto, a existência de limitações difusionais, pode fazer em alguns processos, que a utilização de biocatalisadores completamente carregados não seja a melhor solução (Ramos et al., 2015). Para avaliar a influência da carga enzimática sobre as propriedades catalíticas dos biocatalisadores preparados por imobilização da LGC em partículas de MANAE-agarose, foram oferecidas uma concentração de proteínas que variou de 1 a 8,5 mg por grama de suporte. Na Tabela 6 encontram-se os resultados da influência do carregamento de proteína nos parâmetros de imobilização e AH (hidrólise de óleo de oliva) da LGC imobilizada em MANAE-agarose.

Tabela 6 - Influência do carregamento de proteína nos parâmetros de imobilização e atividade hidrolítica da LGC imobilizada no MANAE-agarose em pH 7.

Carregamento de proteína (mg/g de suporte)	AO (IU/mL)	RI (%)	PI (mg/g de suporte)	AH (IU/g)	AR (%)
1,0	$229,0 \pm 1,7$	$100,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$45,4 \pm 1,2$	19,8
1,5	$343,5 \pm 1,5$	$95,0 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,2$	$55,5 \pm 1,7$	17,0
2,0	$458,0 \pm 1,2$	$93,7 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,0$	$68,7 \pm 2,0$	16,0
3,5	$801,5 \pm 1,1$	$79,7 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,1$	$90,1 \pm 1,9$	14,1
4,0	$916,0 \pm 1,4$	$75,8 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,2$	$87,2 \pm 2,1$	12,6
7,0	$1603,0 \pm 1,8$	$52,6 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,1$	$80,9 \pm 1,9$	9,6
8,5	$1946,5 \pm 1,9$	$52,9 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,2$	$81,1 \pm 2,1$	7,9

AO = Atividade oferecida; RI = Rendimento de imobilização; PI = Concentração de proteína imobilizada; AH = Atividade hidrolítica; AR = Atividade recuperada.

Fonte: do Autor.

Observou-se que para a faixa estudada de carregamento de proteína (1 a 8,5 mg) a saturação do suporte não foi alcançada, pois os valores de proteína imobilizada continuaram a aumentar de acordo com a concentração oferecida. Entretanto, foi possível observar que a atividade do derivado atingiu uma máxima atividade (90,1 U/g) para o carregamento de 3,5 mg de proteína, e que para carregamentos superiores houve uma sensível diminuição deste valor. Por esse motivo, acredita-se que a saturação do suporte esteja muito próxima ao valor de 8,5 mg, e assim esse carregamento foi escolhido para as reações de hidrólise com óleo de oliva.

5.4 DETERMINAÇÃO DO PH E TEMPERATURA ÓTIMOS EM MEIO AQUOSO

O efeito do pH na atividade catalítica da lipase imobilizada em MANAE-agarose (em pH 7), foi determinado pela hidrólise do óleo de oliva em emulsão para o intervalo de pH variando de 5 a 9 (Figura 15.a). Os resultados obtidos para a lipase imobilizada, utilizando-se baixo carregamento (1 mg/ g de suporte), foram comparados com os resultados da lipase livre descrito por Ramos et al. (2015) (Figura 15.a).

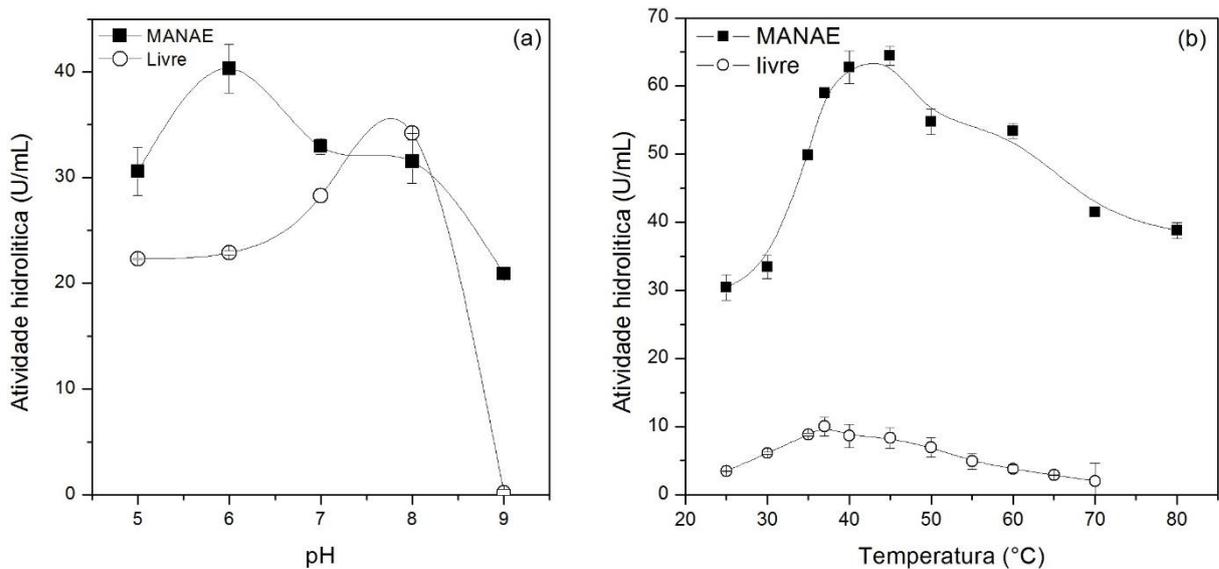


Figura 15 - Efeito do pH e temperatura na atividade hidrolítica da LGC livre e imobilizada em MANAE-agarose, utilizando-se 50% (v/v) de óleo de oliva emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min. (a) pH, (reações realizadas a 37°C); (b) Temperatura, (reações realizadas em pH 6).

Fonte: do Autor.

Dentre os valores de pH avaliados, a LGC imobilizada apresentou uma maior atividade hidrolítica para o pH 6, enquanto a enzima livre apresentou sua maior atividade hidrolítica para o pH 8 (RAMOS et al., 2015). No momento em que a lipase se liga ionicamente ao suporte MANAE-agarose, adquire-se uma certa conformação, buscando a sua estabilidade. A alteração

do pH do meio reacional irá fazer agora com que a enzima sofra interações com o meio em que está inserida, e como a superfície do suporte se encontra ácida, (devido à protonação dos seus grupos aminos primários com $pK_a < 7,0$), a enzima tenderá a se estabilizar e apresentará um pH ótimo para um meio mais ácido. Na literatura relata-se que geralmente, as ligações de enzimas em suportes carregados com cátions, podem resultar em uma acidificação no pH ótimo (HUNG, et al., 2003), corroborando com os resultados encontrados para a LGC imobilizada em MANAE-agarose.

A imobilização da lipase, para toda a faixa de pH estudada, a exceção do pH 8, proporcionou que a enzima retivesse melhor a sua atividade do que para a lipase livre. Destaca-se que para o pH 9 a lipase manteve 50% de sua atividade máxima, (determinada para o pH ótimo de 6), enquanto que para a enzima livre houve a perda total de sua atividade.

O efeito da temperatura de reação na atividade hidrolítica da lipase imobilizada foi determinado para a faixa de 25 a 80°C, e comparado com a atividade da enzima livre (Figura 15.b). A máxima atividade hidrolítica para a lipase imobilizada foi observada para a temperatura de 45°C, enquanto que para a lipase livre foi de 37°C. O aumento da temperatura de 25 para 37 °C, para a enzima livre e de 25 para 45 °C para a enzima imobilizada propiciou um aumento dos valores iniciais da velocidade de reação, devido à uma possível diminuição da viscosidade do meio reacional e a uma maior frequência das colisões entre a lipase e as moléculas de substrato que favoreceram a reação de hidrólise (LAGE et al., 2016).

É possível observar que acima do ponto de inflexão de cada curva, houve um decréscimo das atividades iniciais, devido à distorção e consequente inativação da lipase. Entretanto, o aumento da temperatura influenciou menos as atividades iniciais da lipase imobilizada do que quando comparada a enzima livre, ou seja, a lipase imobilizada aparentou uma maior estabilidade térmica, entretanto essa discussão será retomada em tópico posterior, quando será avaliada a estabilidade térmica para a lipase imobilizada.

O cálculo da energia de ativação (E_a), que é a energia requerida para a ativação do complexo enzima substrato (ES) foi realizado para a enzima livre e imobilizada, utilizando-se a equação de Arrhenius, no intuito de se ter uma melhor avaliação da influência da temperatura (Figura 16) (Apêndice B).

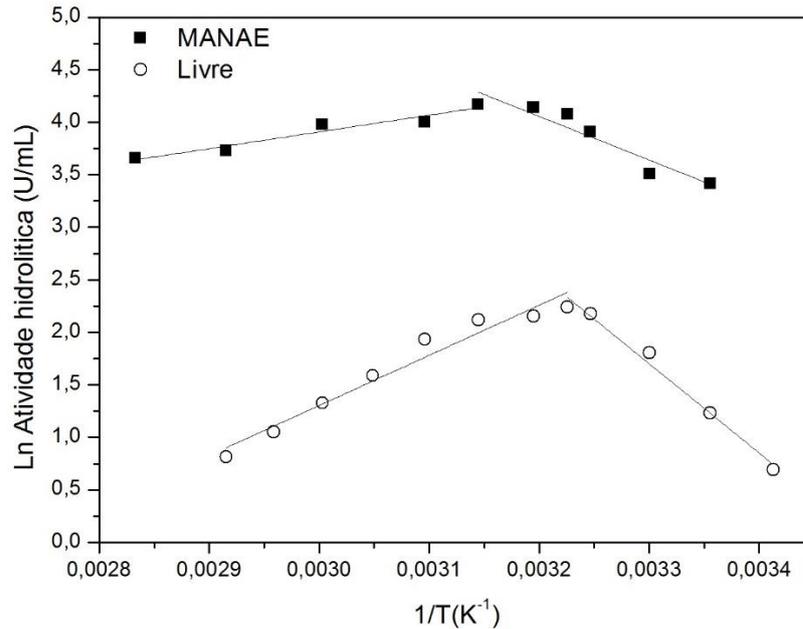


Figura 16 - Determinação da energia de ativação, utilizando a equação de Arrhenius, para a LGC livre e imobilizada. O coeficiente de determinação (R^2) para ambos ajustes foi superior a 0,90.

Fonte: do Autor.

O valor da energia de ativação (E_a) encontrado para a lipase imobilizada foi de 34,5 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto que para a enzima livre foi de 70,64 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, mostrando que a imobilização proporcionou uma redução em cerca de 50% da energia de ativação necessária para a formação do complexo ES.

5.5 EFEITO DO SUBSTRATO

A influência da concentração de substrato (óleo de oliva), na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada foi avaliada (Figura 17), sendo adotado o modelo de cinética de Michaelis-Menten. Os parâmetros cinéticos como $v_{\text{máx}}$ e K_m (Tabela 7) foram obtidos pelo ajuste efetuado pelo software Origin pro 8.0, obtendo-se um elevado coeficiente de determinação tanto para a lipase livre ($R^2=0,995$), quanto para a lipase imobilizada ($R^2=0,968$). Nestes ensaios foram utilizados 1 mL da LGC livre (22,9 U) e 0,1 g do derivado (LGC imobilizada em MANAE-agarose) de baixa carga (22,9 U).

Na Tabela 7, observa-se que a quantidade de produto formado por minuto de reação ($v_{\text{máx}}$) foi maior para a lipase imobilizada (45,22 U/mL) do que para lipase livre (11,58 U/mL), indicando que o derivado foi mais ativo. Isso pode ser explicado devido a menor energia de ativação requerida pela enzima imobilizada em comparação com a enzima livre, corroborando com os dados de E_a encontrados anteriormente. Consequentemente, é possível verificar que o valor de K_M , o qual é uma constante que determina a quantidade necessária de substrato para

se obter a metade da atividade máxima, obtido para a lipase imobilizada (236,9 mmol/L) foi um pouco inferior do que para a livre (366,7 mmol/L).

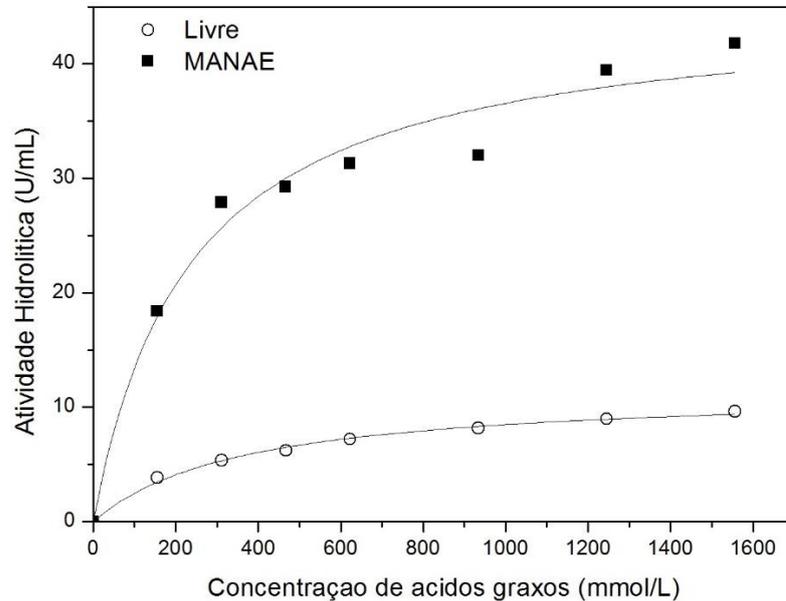


Figura 17 - Efeito da concentração de ácidos graxos livres (AGL) para a LGC livre e imobilizada. As reações foram realizadas a 45°C e pH 6, utilizando-se óleo de oliva emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min.

Fonte: do Autor.

Tabela 7 - Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a LGC livre e imobilizada em reações de hidrólise utilizando óleo de oliva emulsificado.

Parâmetros	Parâmetros	
	MANAE-agarose	Enzima livre
v_{\max} (U/mL)	45,22	11,58
K_M (mmol/L)	236,9	366,7
K_{cat} (min^{-1})	29393,4	7527,3
K_{cat}/K_M	124,07	20,52
$1/K_M$	0,0042	0,0027
ΔG_{E-S} (kJ/mmol)	14,46	15,62
ΔG_{E-T} (kJ/mmol)	-12,75	-7,99

Fonte: do Autor.

O valor encontrado de K_{cat} para a lipase imobilizada ($29393,4\text{min}^{-1}$) foi maior do que para a lipase livre ($7527,3\text{min}^{-1}$). K_{cat} representa o número máximo de reações catalisadas por minuto e por sítio catalítico, e como se verificou um valor muito alto da velocidade máxima

para a lipase imobilizada em relação à lipase livre, um maior valor de K_{cat} para o derivado era esperado.

É difícil comparar os valores encontrados com a literatura, pois para a lipase de *G. candidum*, existe apenas um único trabalho que reporta os valores de $v_{m\acute{a}x}$ (0,384 U/mL) e K_m (0,465 mmol/L) para a enzima livre, mas onde foi utilizado para-nitrofenil butirato como substrato. É bem conhecido que estes parâmetros dependem do tipo de substrato empregado (SOUZA et al., 2015), entretanto é possível verificar que a lipase em questão possui preferência em hidrolisar um óleo de cadeia longa, a um substrato de cadeia curta.

Para a fase de afinidade (ΔG_{E-S}), os resultados obtidos para a energia livre de Gibbs mostraram a não espontaneidade da interação da lipase com o substrato, tanto para a lipase livre, quanto para a imobilizada, pois os valores obtidos foram positivos e próximos (14,46 e 15,62 kJ/mol). Em outras palavras, para que haja a formação do complexo enzima-substrato (ES) é necessário o fornecimento de energia para o sistema, pelo aumento de temperatura (SALEEM et al., 2005). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos para a temperatura ótima, para os quais foi verificado que é necessário um incremento da temperatura para que a reação atinja a máxima atividade hidrolítica tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada (em 45°C).

Para a fase catalítica (ΔG_{E-T}), a energia livre de Gibbs encontrada para ambas é negativa, mostrando que esta reação é espontânea na fase de liberação do produto, ou seja, o grau de desordem da reação está aumentando, e a enzima está liberando para o sistema uma parte da energia recebida na fase de afinidade. Como para o derivado o valor encontrado de ΔG_{E-T} é mais negativo (-12,75 kJ/mol) do que para a lipase livre (-7,99 kJ/mol), significa que mais produto está sendo formado quando é utilizado o derivado do que a enzima livre, corroborando os dados de $v_{m\acute{a}x}$ discutidos anteriormente.

5.6 ENSAIOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA

A análise da estabilidade térmica da LGC livre e imobilizada foi realizada em 4 diferentes temperaturas. Os parâmetros utilizados para determinar a termoestabilidade da lipase como a meia-vida da enzima ($t^{1/2}$), a constante de desnaturação irreversível (k_d), a quantidade mínima de energia necessária para ocorrer sua desnaturação (E_D), a entalpia de desnaturação (ΔH_D^*), a entropia associada à desnaturação térmica (ΔS_D^*) e a energia livre de Gibbs durante a desnaturação térmica (ΔG_D^*) estão representados na Tabela 8, e foram obtidos a partir dos dados das curvas de desnaturação térmica (Figuras. 18 e 19), os quais foram ajustados pelo modelo

de Sadana e Henley (1987) e a obtenção de E_D foi possível com o ajuste linear para a equação de Arrhenius (Figura 20) (Apêndice C). Nestes ensaios foram utilizados 1 mL da LGC livre não purificada (22,9 U) e 0,1 g do derivado (LGC immobilizada em MANAE-agarose) de baixa carga (22,9 U).

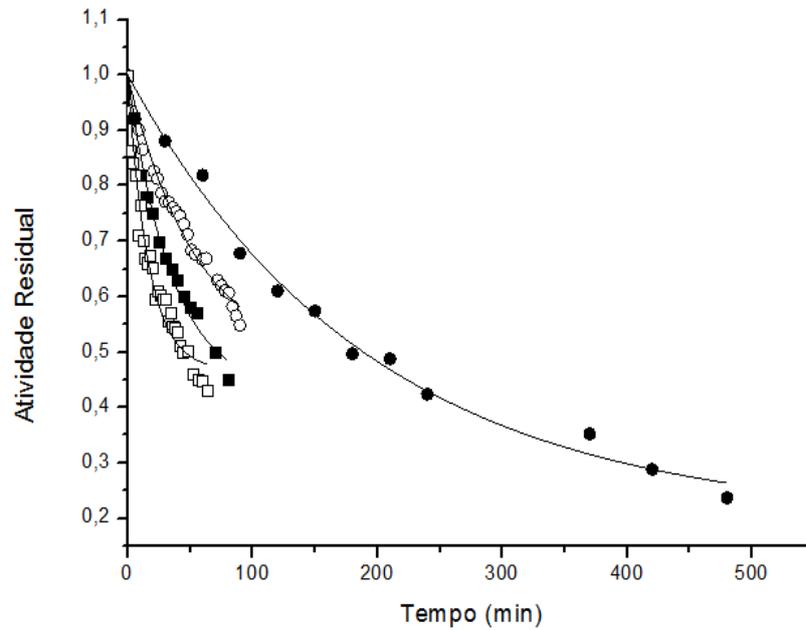


Figura 18 - Curvas de inativação térmica para a LGC livre (pH 6), a 35 °C (■), 40 °C (□), 45 °C (●) e 50 °C (○).

Fonte: do Autor.

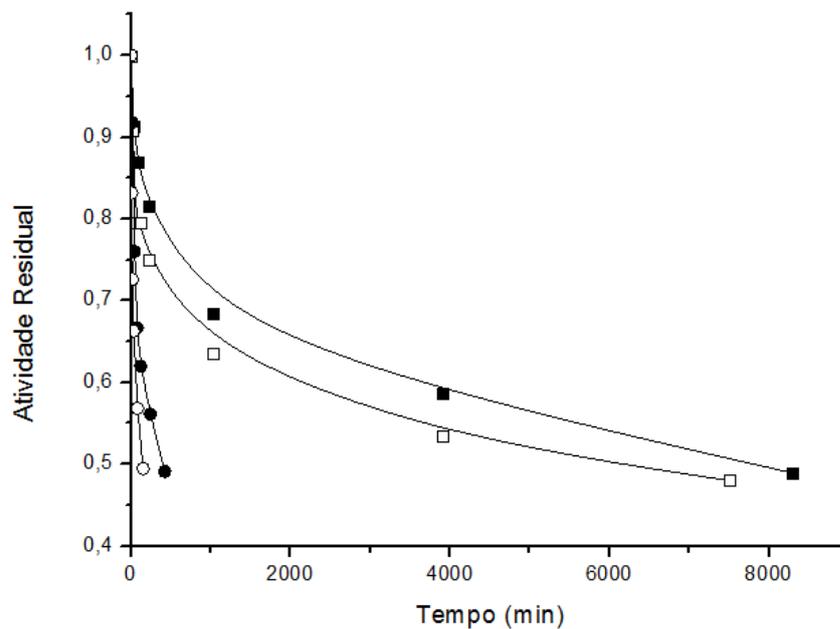


Figura 19 - Curvas de inativação térmica para a LGC immobilizada em MANAE-agarose (pH 6), a 35 °C (■), 40 °C (□), 45 °C (●) e 50 °C (○).

Fonte: do Autor.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a LGC livre e imobilizada incubada em diferentes temperaturas, utilizando como substrato o óleo de oliva.

Parâmetros	Lipase	Temperatura (°C)			
		35	40	45	50
R ²	L	0,98	0,96	0,96	0,92
	D	0,90	0,87	0,98	0,95
k _d (min ⁻¹)	L	0,0051	0,0150	0,0280	0,0589
	D	0,0021	0,0052	0,0150	0,0571
t ^{1/2} (min)	L	190	110	62	11
	D	8280	7453	420	147
E _D (kJ/mol)	L	L = 132,04			
	D	D = 181,18			
ΔH _D [*] (kJ/mol)	L	129,48	129,44	129,40	129,36
	D	178,62	178,58	178,54	178,50
ΔG _D [*] (kJ/mol)	L	99,52	98,37	98,32	97,92
	D	101,79	101,12	99,98	98,00
ΔS _D [*] (J/mol)	L	97,29	99,28	97,73	97,34
	D	249,45	247,45	247,03	249,19

L= enzima livre; D= enzima imobilizada (derivado)

Fonte: do Autor.

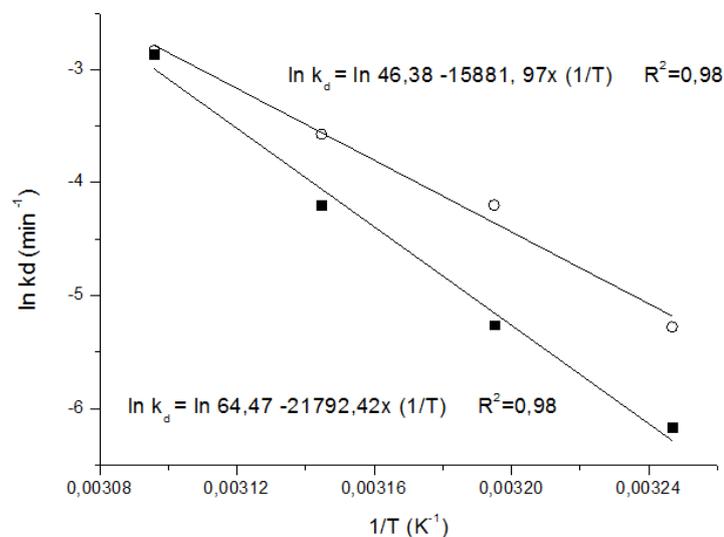


Figura 20 - Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desnaturação (E_D) para a LGC, usando como substrato o óleo de oliva. Lipase livre (○) e imobilizada (■).

Fonte: do Autor.

A meia-vida de uma enzima ($t^{1/2}$) é o tempo após o qual a atividade enzimática decresce até 50% do valor de sua atividade inicial a uma dada temperatura. Uma meia-vida mais longa é uma indicação de que a enzima pode resistir a essa temperatura por mais tempo (SOUZA et al., 2015). A imobilização em MANAE-agarose possibilitou um aumento da meia vida da LGC para todas as temperaturas estudadas. A lipase imobilizada foi 43 vezes mais estável do que a livre a temperatura de 35°C, 68 vezes a 40°C, 6 vezes a 45°C e 13 vezes a 50°C.

Entretanto, os valores de tempo de meia vida, tanto para a lipase livre como imobilizada diminuem com o aumento da temperatura, devido à uma maior desnaturação da enzima. Observou-se que o valor de meia vida para a lipase imobilizada incubada a 35°C (8280 min) é cerca de 56 vezes maior do que o valor encontrado de tempo de meia vida para sua encubação a 50°C (147 min).

Verificou-se que a energia de desnaturação térmica (E_D), que é a energia requerida para que a enzima seja desnaturada (modificação conformacional irreversível), é maior para a lipase imobilizada do que para a livre, significando que é necessário fornecer uma maior quantidade de energia (térmica) para que a enzima seja desnaturada. Dessa forma, pôde-se observar que a imobilização da LGC possibilitou uma melhoria em sua termoestabilidade.

Os resultados obtidos para os valores dos parâmetros termodinâmicos também confirmaram essa melhoria na termoestabilidade da LGC. Para a entalpia de desnaturação observou-se que foram encontrados maiores valores para a lipase imobilizada do que para a livre, para todos os valores de temperatura estudados. A energia de desnaturação (E_D) está diretamente relacionada com a entalpia de desnaturação (ΔH_D^*), a qual representa a quantidade total de energia necessária para a desnaturação da enzima. Valores elevados e positivos de E_D e ΔH_D^* são frequentemente associados com uma elevada estabilidade térmica da enzima (SAQIB et al. 2010).

Entretanto, embora um elevado valor de ΔH_D^* sugira que a LGC imobilizada seja muito mais termoestável do que a LGC livre, também é importante observar os parâmetros ΔG_D^* e ΔS_D^* . Estes são também indicadores para a análise da estabilidade térmica da enzima e sua desnaturação (SAQIB et al. 2010; SOUZA et al., 2015).

Os valores de energia livre de Gibbs encontrados para a lipase imobilizada estão levemente maiores do que para lipase livre, em todas a temperaturas avaliadas. O parâmetro ΔG_D^* representa a espontaneidade com que a enzima se torna menos estável e de fácil desnaturação e assim para se afirmar que uma enzima possui uma elevada estabilidade térmica é necessário que se obtenham valores elevados e positivos para este parâmetro (SAQIB et al.

2010; SOUZA et al., 2015). Dessa forma, os valores para a energia livre de Gibbs encontrados neste trabalho corroboraram com os valores encontrados para E_D e ΔH_D^* .

A extensão da desnaturação térmica enzimática também depende da entropia de desnaturação (ΔS_D^*), que expressa a quantidade de energia por grau envolvido na transição do estado nativo para um estado desnaturado da enzima (SOUZA et al., 2015). Conforme mostrado na Tabela 8, os valores de ΔS_D^* foram positivos para todas as temperaturas, tanto para a enzima livre como imobilizada, o que significa que ocorreu um aumento da desordem ou do grau de aleatoriedade, em consequência de tal estado de transição. E como verificado anteriormente, foi necessária uma maior energia para levar a enzima imobilizada ao estado de desnaturação (181,18 kJ/mol), quando comparada a enzima livre (132,04 kJ/mol) e conseqüentemente se verificou um maior grau de desordem para a enzima imobilizada do que para a livre.

Assim, após a análise dos parâmetros termodinâmicos pôde-se verificar que a imobilização em MANAE-agarose possibilitou uma maior estabilização térmica da LGC, permitindo que a enzima aumentasse a sua meia vida para todas as temperaturas estudadas, possibilitando dessa forma, ampliar sua faixa de aplicação no que se refere às reações de hidrólise para o óleo de oliva.

5.7 EMPREGO DA LGC LIVRE E IMOBILIZADA NA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE OLIVA

As reações de hidrólise para o óleo de oliva (Figura 21) foram realizadas sem a adição de agente emulsificante (goma arábica), sendo utilizado apenas uma elevada agitação (1000 rpm) para garantir o contato efetivo entre a lipase e o substrato (SANTOS et al., 2013). No ensaio com a enzima livre foi empregado um volume de 15 mL de caldo de fermentação (sem células) com atividade de 20,52 U/ml, totalizando uma atividade inicial de 308 U. Para a lipase imobilizada, uma mesma atividade inicial foi oferecida, que correspondeu a 3,8 g de biocatalisador, tendo sido utilizado na imobilização a carga de proteína de 8,5 mg/g de suporte, que correspondeu ao maior valor de proteína imobilizada obtido nos ensaios de carregamento (4,5 mg/g de suporte).

Em cada reação (Figura 21) foram empregadas as condições ótimas de temperatura e de pH, para a lipase livre e imobilizada, obtidas nos ensaios anteriores.

A hidrólise do óleo de oliva, para as condições empregadas, foi catalisada com maior eficiência pela LGC imobilizada em MANAE-agarose, atingindo 100% de hidrólise em 120 min. A lipase livre atingiu 95,5 % de hidrólise em 140 min.

Wang et al., (1998) estudaram a hidrólise do óleo de oliva sem a utilização de agente emulsificante, com agitação mecânica de 1000 rpm catalisado pela lipase de *Cândida rugosa*. Os autores utilizaram 5 mg de lipase livre para uma fração inicial de óleo de oliva de 0,05, cinco vezes menor do que a fração inicial de óleo utilizada neste estudo (0,25) e obtiveram menos de 35% de hidrólise em 60 min de reação.

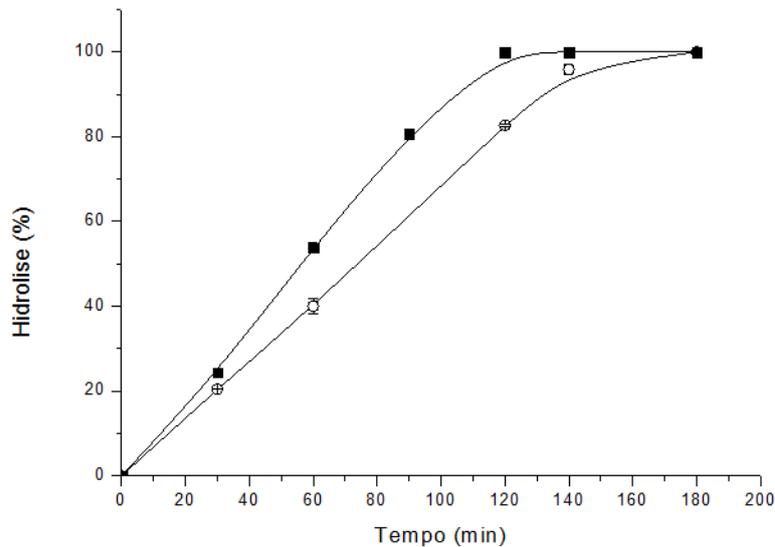


Figura 21 - Perfil da reação de hidrólise para o óleo de oliva: LGC livre (○), 37°C, pH 8,0 e GC imobilizada (■), 45°C e pH 6,0.

Fonte: do Autor.

Avelar et al., (2013) reportaram a hidrólise do óleo de canola em tanque agitado, sem adição de emulsificante, pela lipase vegetal de semente de mamona (2 % m/v), obtendo total conversão em duas horas de reação, para uma fração inicial de 0,3. Cavalcanti-Oliveira et al., (2011) verificaram, após condições otimizadas, uma conversão de 89 % em 48 horas, à 60 °C, para a hidrólise de óleo de soja catalisada pela lipase TL 100L, utilizando uma fração inicial de 0,5 de óleo de soja. Vescovi et al., (2016) observaram a hidrólise de óleo de fritura pela lipase de *Thermomyces lanuginosus*, com fração inicial de 0,25 de óleo, à 30 °C, obtendo uma conversão de 94% em 12 horas de reação, e durante o reciclo para a TLL imobilizada foi observado 42 % de conversão no quinto ciclo de reutilização (pH 4,6 e 10 horas de reação).

Pelos resultados obtidos neste trabalho verifica-se que a hidrólise enzimática do óleo de oliva pela LGC, tanto livre quanto imobilizada, apresentou um excelente resultado, pois na reação foi utilizada uma fração inicial de óleo de 0,25, uma baixa concentração de lipase, sem a presença de agente emulsificante ou solvente, tornando a reação e a etapa de purificação dos

ácidos graxos mais fácil, econômica e ainda sem a geração de subprodutos indesejáveis ou de resíduos prejudiciais ao meio ambiente.

5.7.1 Reciclo para o derivado MANAE-agarose

A reutilização do biocatalisador é um fator desejável para viabilizar o emprego do mesmo em reações de interesse industrial, por esse motivo foram realizados ensaios visando verificar-se a capacidade de reutilização do derivado MANAE-agarose, para a reação de hidrólise do óleo de oliva, nas mesmas condições estudadas no item anterior (5.7).

Na Figura 22 encontram-se os três ciclos realizados para a hidrólise do óleo de oliva catalisado por LGC imobilizada em MANAE-agarose.

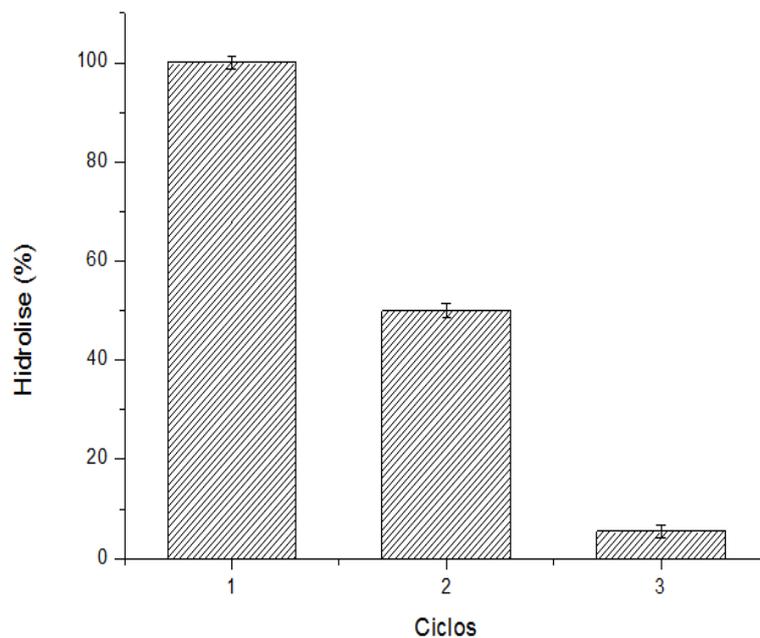


Figura 22 - Testes de reciclo para a reação de hidrólise para o óleo de oliva para a LGC imobilizada em MANAE-agarose, a 45°C e pH 6,0, em 120 min.

Fonte: do Autor.

Observou-se que, ao final do segundo ciclo houve, praticamente, uma perda de 50% na conversão da reação de hidrólise, e ao final do terceiro ciclo, foi alcançado para a hidrólise do óleo de oliva apenas 5,5 %. A possível explicação para esse fato é a formação, ao longo da reação de hidrólise, de di e mo-glicerídeos que atuam como detergentes não iônicos, que acarretam no desprendimento da lipase do suporte, causando uma perda da atividade e consequentemente uma queda na porcentagem de hidrólise. Os detergentes não iônicos são utilizados para liberar as moléculas de lipase a partir de suportes heterofuncionais com ligações do grupo acila (VIRGEN-ORTIZ et al., 2017).

Esse resultado não inviabiliza o emprego desse derivado em outro tipo de hidrólise, que não envolva óleos vegetais, nas quais a chance da lipase ser desorvida do suporte é menor. Entretanto, este trabalho se focou na produção de ácidos graxos concentrados a partir de óleos vegetais, assim, optou-se na continuidade do mesmo pelo emprego da LGC livre para a reação de hidrólise dos óleos de algodão e de palmiste, justificando o estudo da LGC livre para estes substratos.

5.8 EMPREGO DA LGC LIVRE NA HIDRÓLISE DE OUTROS ÓLEOS VEGETAIS

Os resultados de propriedades catalíticas e estabilidade térmica da LGC, utilizando diferentes óleos vegetais (óleos de algodão e de palmiste), são reportados a seguir. Os óleos possuem diferentes composições de ácidos graxos (Apêndice A), permitindo verificar a especificidade da LGC para diferentes substratos. Nos ensaios a seguir, foram utilizados 1 mL de LGC livre sem purificação (0,1 mg de enzima) para ambos os substratos (óleos de algodão e de palmiste).

5.8.1 Propriedades catalíticas da LGC livre em meio aquoso

A Figura 23 mostra o efeito do pH, no intervalo de 5,0 a 9,0, para a atividade hidrolítica da LGC livre, obtida para as reações de hidrólise onde foi utilizado como substrato os óleos de algodão e de palmiste.

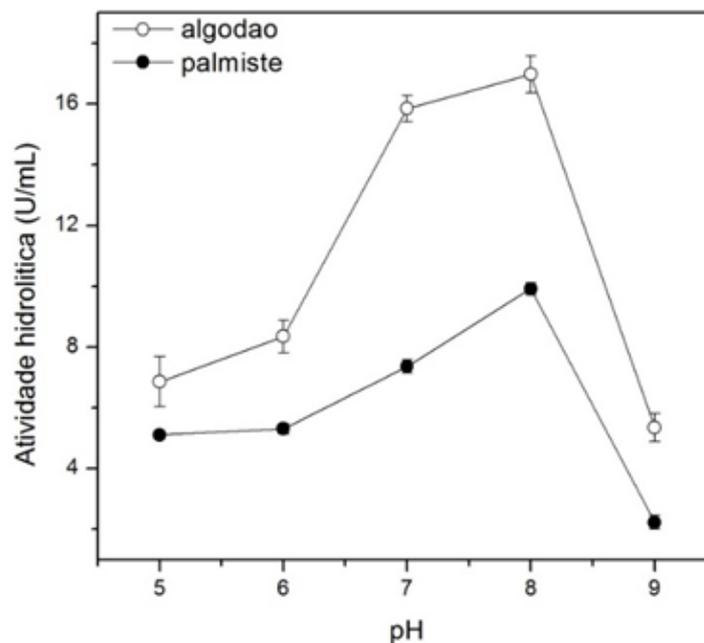


Figura 23 - Efeito do pH na atividade hidrolítica da LGC livre. As reações foram realizadas a 37 °C, utilizando-se 50% (v/v) de óleo vegetal emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min.

Fonte: do Autor.

Verificou-se que para ambos os substratos utilizados, o valor do pH ótimo foi de 8,0. Nesta condição, a máxima atividade hidrolítica para o óleo de algodão foi de $17,00 \pm 0,61$ U/mL e para óleo de palmiste foi de $9,92 \pm 0,20$ U/mL. Embora o valor do pH ótimo tenha sido o mesmo para ambos os óleos vegetais, utilizados como substrato nas reações de hidrólise, o valor da atividade máxima encontrada para cada substrato foi diferente, sendo o valor encontrado para o óleo de algodão quase o dobro do valor observado para o óleo de palmiste. Isto pode ser explicado devido à especificidade da LGC produzida. Em trabalhos anteriores, realizados no laboratório de Bioprocessos, verificou-se que a LGC produzida, por fermentação submersa, utilizando-se o óleo de algodão como indutor e única fonte de carbono, apresentava uma elevada especificidade em hidrolisar as ligações ésteres dos triacilgliceróis que continham ácidos graxos de cadeia longa e insaturados nas posições *cis*-9 ou *cis*-9,12, como nos ácidos oleico e linoleico (CASTRO et al., 2016).

Essa especificidade é muito útil, pois a hidrólise das ligações que contenham ácidos graxos de cadeia longa por lipases que não apresentam esta especificidade ocorrem, geralmente, muito lentamente. Outra vantagem a ser destacada é a hidrólise seletiva de ligações específicas nos triacilgliceróis, a qual permite a construção e manipulação dessas moléculas, e também a produção de ácidos graxos livres que possuem interesse do ponto de vista industrial (JACOBSEN; OLSEN; ALLERMANN, 1990). Dessa forma, era esperado que essa lipase apresentasse uma maior atividade hidrolítica para óleos vegetais ricos em sua composição de ácidos graxos de cadeia longa e insaturada, como o óleo de oliva, de soja e de algodão. Estes óleos possuem mais de 70 % de sua composição formados pelos ácidos oleico e linoleico, porém, o óleo de palmiste apresenta apenas cerca de 16 % de ácido oleico em sua composição e 47 % de ácido láurico (SANTOS et al., 2013).

O efeito do aumento da temperatura na atividade hidrolítica da lipase, variando de 20 a 50 °C está mostrado na Figura 24. A máxima atividade hidrolítica foi observada a 37 °C para ambos os substratos utilizados, correspondendo a $14,2 \pm 0,10$ U/mL para o óleo de algodão e a $9,92 \pm 0,20$ U/mL para o óleo de palmiste. O aumento da temperatura de 20 para 37 °C aumentou os valores iniciais da velocidade de reação para ambos os óleos vegetais, provavelmente devido à ocorrência de uma maior frequência das colisões entre a lipase e as moléculas de substrato e também pela diminuição da viscosidade do meio reacional, favorecendo a reação de hidrólise (RAMOS et al., 2015). Dessa forma, pode-se afirmar que o efeito do incremento da temperatura sobre a atividade hidrolítica para esta faixa estudada (20 à 37 °C) é uma característica intrínseca da enzima e foi independente do substrato utilizado.

Para ambos os substratos utilizados, observou-se um decréscimo das atividades iniciais de reação após um aumento de temperatura acima de 37°C (ponto de máxima atividade) devido à distorção da lipase e a sua inativação, ocasionada pelo aumento de temperatura (LAGE et al., 2016).

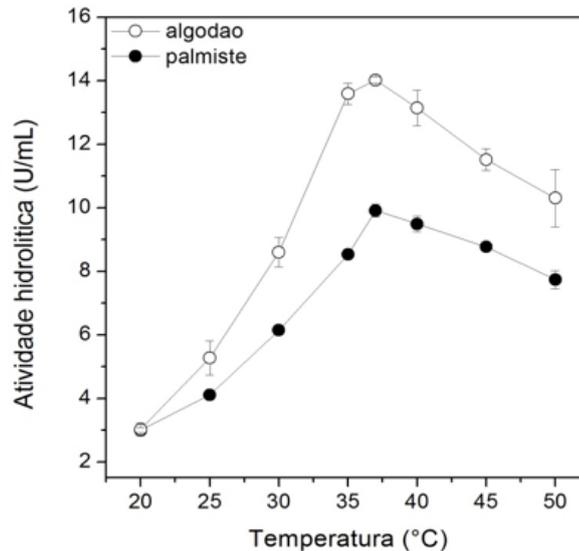


Figura 24 - Efeito da temperatura para atividade hidrolítica da LGC livre. As reações foram realizadas a pH 8,0 (tampão de fosfato de sódio, 100 mmol/L), utilizando-se 50% (v/v) de óleo vegetal emulsificado como substrato e incubadas em shaker orbital (200 rpm) por 5 min.

Fonte: do Autor.

Na Figura 25, está representado o efeito da concentração do substrato para a atividade hidrolítica da lipase livre produzida. Para a determinação dos parâmetros cinéticos $v_{m\acute{a}x}$ e K_m (Tabela 9) foi adotado o modelo de cinética de Michaelis-Menten e o ajuste dos dados da equação foi efetuado pelo software Origin pro 8.0, obtendo-se um elevado coeficiente de determinação ($R^2_{\text{algod\~{a}o}} = 0,986$ e $R^2_{\text{palmiste}} = 0,993$).

Na Tabela 9, observa-se que a quantidade de produto formado por minuto de reação ($v_{m\acute{a}x}$) foi superior para o óleo de algodão (16,29 IU/mL) do que para o óleo de palmiste (10,94 IU/mL). Isso pode ser explicado devido à diferença da composição de ácidos graxos existente entre os dois óleos, pois o óleo de algodão possui uma maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, do que o óleo de palmiste (RAMOS et al., 2016). Uma vez que a LGC possui uma elevada especificidade para hidrolisar as ligações ésteres de ácidos graxos insaturados, justifica-se que a enzima tenha uma maior expressão de atividade para o óleo de algodão do que para o óleo de palmiste. Conseqüentemente, é possível afirmar que a lipase produzida possui uma maior afinidade pelo óleo de algodão, o que pode ser comprovado também observando os valores de K_m , onde para a expressão da metade da atividade máxima,

a lipase necessita de uma menor concentração de substrato (508,32 mmol/L) se comparado com o óleo de palmiste (612,95 mmol/L).

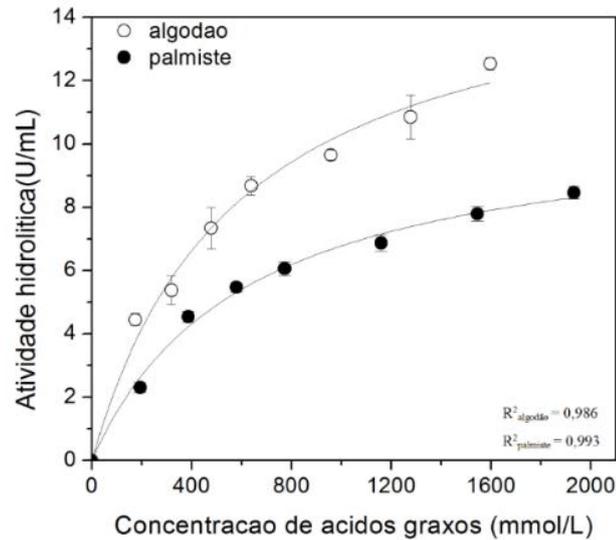


Figura 25 - Efeito da concentração de ácidos graxos livres (AGL) na atividade hidrolítica da LGC livre. As reações foram realizadas a pH 8,0 (tampão fosfato de sódio, 100 mmol/L), a 37 °C e incubadas por 5 min em shaker orbital (200 rpm).

Fonte: do Autor.

Tabela 9 - Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da LGC livre para as reações de hidrólise utilizando óleo vegetal emulsificado.

Parâmetros	Óleos vegetais	
	Algodão	Palmiste
v_{\max} (IU/mL)	16,29	10,94
K_M (mmol/L)	508,32	612,95
K_{cat} (min^{-1})	10591,68	7113,134
K_{cat}/K_M	18,19	11,61
$1/K_M$ (L/mmol)	0,0017	0,0016
ΔG_{E-S} (kJ/mmol)	16,41	16,54
ΔG_{E-T} (kJ/mmol)	-7,48	-6,32

Fonte: do Autor.

Com relação à constante de reação na fase catalítica (K_{cat}), que representa o número máximo de reações catalisadas por minuto, verifica-se que como a lipase expressou uma maior velocidade para o óleo de algodão, devido à sua seletividade (conforme reportado

anteriormente), já era esperado que o valor encontrado de K_{cat} para o óleo de algodão (10591,68 min^{-1}) fosse maior do que para o óleo de palmiste (7113,134 min^{-1}).

Os valores obtidos para a energia livre de Gibbs para a fase de afinidade (ΔG_{E-S}) foram positivos e muito similares, para ambos os óleos (16,41 e 16,45 kJ/mmol), mostrando que a interação do substrato com a lipase não é espontânea, ou seja, para que ocorra a formação do complexo enzima-substrato (ES) é necessário o fornecimento de energia para o sistema, através do aumento de temperatura (SALEEM et al., 2005). Esses valores corroboram com os dados obtidos anteriormente, no estudo da temperatura ótima, onde foi possível observar um aumento da atividade enzimática atrelado com o aumento da temperatura, até o intervalo no qual se atingiu a temperatura ótima (37 °C), para ambos os óleos utilizados. Em outras palavras, pode-se afirmar que a reação enzimática que ocorre a temperatura ambiente é muito lenta sendo necessário o incremento de temperatura para que a lipase expresse uma maior atividade, no caso para a temperatura ótima encontrada de 37 °C. Ainda pode-se afirmar que a energia requerida para a formação do complexo ES é uma característica intrínseca desta lipase, pois os valores observados de ΔG_{E-S} para ambos os óleos foram muito similares.

A energia livre de Gibbs para a fase catalítica (ΔG_{E-T}) é negativa, significando que esta reação é espontânea na fase de liberação do produto. Isso significa que o grau de desordem da reação está aumentando, e a enzima está liberando para o sistema uma parte da energia recebida na fase de afinidade. Como para óleo de algodão o valor encontrado de ΔG_{E-T} é menor (-7,48 kJ/mol) do que para o palmiste (-6,32 kJ/mol), significa que mais produto está sendo formado quando é utilizado como substrato o óleo de algodão do que o de palmiste, corroborando os dados discutidos anteriormente.

5.8.2 Estabilidade térmica para a LGC livre

A análise da estabilidade térmica da LGC livre foi realizada em 4 diferentes temperaturas e os valores dos parâmetros encontrados, necessários para observar a estabilidade térmica da enzima, foram colocados na Tabela 10.

Não se pode fazer uma comparação direta entre os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para os substratos utilizados (Tabela 10), pois a enzima livre utilizada é a mesma, sendo que as diferenças encontradas se referem simplesmente à parte cinética da atuação da enzima frente ao tipo de substrato utilizado e não propriamente em relação à sua diferença de estabilidade térmica. Em outras palavras, só é possível comparar os valores obtidos com a enzima imobilizada e aplicada em reações para estes mesmos substratos. Assim, sugere-se que a parte de comparação seja realizada futuramente em continuidade para este trabalho,

quando a lipase livre possa ser comparada a lipase imobilizada em reações com esses óleos vegetais.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a LGC livre incubada em diferentes temperaturas, utilizando como substrato os óleos de algodão e de palmiste.

Parâmetros	Substrato	Temperatura (°C)			
		35	40	45	50
R ²	A	0,98	0,99	0,94	0,98
	P	0,91	0,91	0,91	0,84
k _d (min ⁻¹)	A	0,0091	0,0161	0,0310	0,0490
	P	0,0004	0,0028	0,0033	0,0579
t ^{1/2} (min)	A	700	160	60	40
	P	13042	2743	803	179
E _D (kJ/mol)	A = 94,25 P = 255,99				
ΔH _D [*] (kJ/mol)	A	91,69	91,65	91,60	91,56
	P	253,43	253,39	253,34	253,30
ΔG _D [*] (kJ/mol)	A	98,02	98,19	98,06	98,41
	P	106,40	102,72	104,00	97,97
ΔS _D [*] (J/mol)	A	-20,57	-20,90	-20,30	-21,22
	P	477,37	481,37	469,64	480,91

A= óleo de algodão; P= óleo de palmiste;

Fonte: do Autor.

As curvas de desnaturação térmica para o óleo de algodão e para o óleo de palmiste estão representadas pelas Figuras 26 e 27, respectivamente. Por meio do modelo de Sadana e Henley (1987) foi possível determinar os parâmetros k_d e t^{1/2}.

A constante de primeira ordem de inativação térmica (k_d) é importante para analisar os efeitos irreversíveis da desnaturação térmica. Quanto menor o valor de k_d ou maior o tempo de meia vida (t^{1/2}), maior será a estabilidade térmica da enzima (SOUZA et al., 2015).

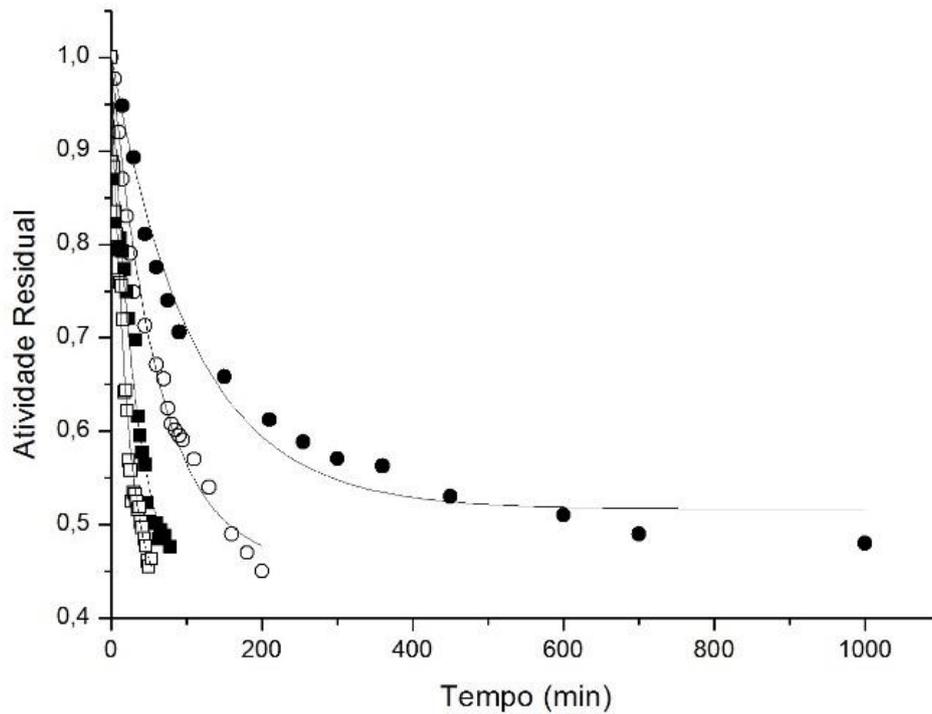


Figura 26 - Curvas de inativação térmica para a atividade residual da LGC livre utilizando óleo de algodão. Os ensaios foram realizados a 35 °C (●), 40 °C (○), 45 °C (■) e 50 °C (□).

Fonte: do Autor.

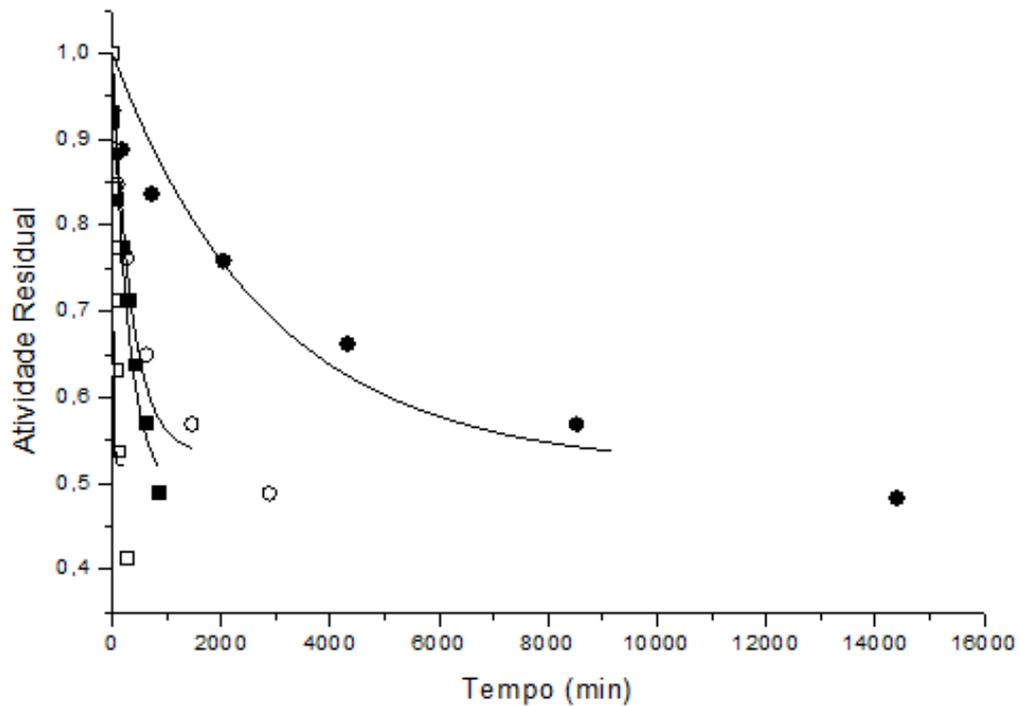


Figura 27 - Curvas de inativação térmica para a atividade residual da LGC livre utilizando óleo de palmiste. Os ensaios foram realizados a 35 °C (●), 40 °C (○), 45 °C (■) e 50 °C (□).

Fonte: do Autor.

Observa-se que os valores de $t^{1/2}$ diminuíram consideravelmente conforme o aumento de temperatura para ambos os substratos, ao contrário dos valores de k_d , que aumentaram progressivamente, mostrando que a desnaturação irreversível se torna cada vez mais significativa à medida que se aumenta a temperatura. Para as temperaturas de 35°C os valores obtidos de k_d ($0,0091 \text{ min}^{-1}$ e $0,0004 \text{ min}^{-1}$) foram os menores dentre as demais temperaturas avaliadas, e os valores de $t^{1/2}$ (700 min e 13042 min) foram considerados elevados para óleo de algodão e de palmiste, respectivamente. Assim, pode-se dizer que a LGC livre possui uma elevada estabilidade para a temperatura de 35°C. Porém, em temperaturas maiores, como de 50 °C, os valores encontrados de $t^{1/2}$ foram sensivelmente menores (40 min e 179 min) e os valores de k_d foram os maiores obtidos ($0,0490 \text{ min}^{-1}$ e $0,0579 \text{ min}^{-1}$), demonstrando que a enzima livre vai perdendo progressivamente sua estabilidade com o aumento da temperatura.

A quantidade mínima para que ocorra a desnaturação térmica é representada por E_D , e sua obtenção foi possível através do ajuste linear para a equação de Arrhenius (Figura 28) (Apêndice D).

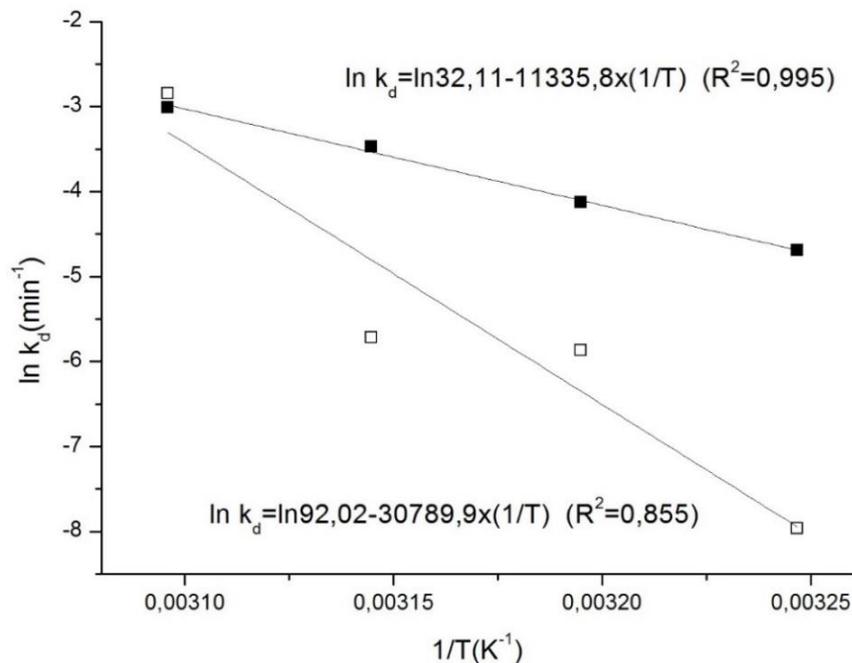


Figura 28 - Ajuste linear de Arrhenius para a determinação da energia de desnaturação (E_D) para a LGC livre, usando como substrato o óleo de algodão (■) e o óleo de palmiste (□).

Fonte: do Autor.

A energia de desnaturação (E_D) está diretamente relacionada com a entalpia de desnaturação (ΔH_D^*), a qual representa a quantidade total de energia necessária para a

desnaturação da enzima. Valores elevados e positivos de E_D e ΔH_D^* são frequentemente associados com uma elevada estabilidade térmica da enzima (SAQIB et al. 2010).

Assim, os elevados e positivos valores de E_D e ΔH_D^* encontrados tanto para o óleo de algodão (94, 25 e ≈ 92 kJ/mol, respectivamente) quanto para o palmiste (255,99 e ≈ 253 kJ/mol, respectivamente) são indicativos de uma elevada estabilidade da LGC livre (MIRANDA et al. 2014).

Entretanto, embora um elevado valor de ΔH_D^* sugira que a LGC livre seja muito termoestável, é importante também observar os parâmetros ΔG_D^* e ΔS_D^* . Estes são também indicadores importantes para a análise da estabilidade térmica da enzima e sua desnaturação, representando respectivamente, a espontaneidade com que a enzima se torna menos estável e de fácil desnaturação e a quantidade de energia por grau necessária para a transição do estado natural da enzima até o estado de desnaturação. (SAQIB et al. 2010; SOUZA et al., 2015).

A energia livre de Gibbs de desnaturação (ΔG_D^*) é considerado um parâmetro mais confiável da estabilidade da enzima. Um valor negativo ou pequeno de ΔG_D^* indica que a reação de desnaturação é favorável, e assim, para se afirmar que uma enzima possui uma elevada estabilidade térmica é necessário que se obtenham valores elevados e positivos para este parâmetro (SAQIB et al. 2010; SOUZA et al., 2015). Dessa forma, os valores de ΔG_D^* encontrados para ambos os substratos, no presente trabalho, que foram de aproximadamente 98 kJ/mol para o óleo de algodão (em todas as temperaturas) e de aproximadamente 106 kJ/mol para o óleo de palmiste (decaindo levemente para as temperaturas mais altas), estão dentro o intervalo de valores (100-115 kJ/mol) de ΔG_D^* descritos em literatura para várias enzimas consideradas termoestáveis (SAQIB et al. 2010; SOUZA et al., 2015).

A desnaturação térmica das enzimas resulta também em um aumento de entropia (ΔS_D^*). Quanto maior a desordem ou o grau de aleatoriedade no processo de desnaturação da enzima, maiores e positivos serão os valores de ΔS_D^* . Entretanto, valores negativos deste parâmetro decorrem de um estado de transição (entre a configuração inicial ou nativa da enzima e a sua forma desnaturada) mais ordenado (SOUZA et al., 2015).

Assim, os valores de entropia de desnaturação para o óleo de palmiste foi consideravelmente alto para todas as temperaturas testadas (em média 477 J/mol K), mostrando um alto grau de desordem e desdobramento do estado natural da enzima para o estado desnaturado. Já os valores negativos de entropia (em média -20 J/mol K) para o óleo de algodão podem ser associados a um grau de desordem menor para o substrato utilizado.

5.8.3 Aplicação da LGC livre na hidrólise de diferentes óleos vegetais

A LGC livre foi aplicada na reação de hidrólise para os óleos de algodão e de palmiste, nas condições de temperatura e pH ótimos, obtidos em ensaios anteriores, que corresponderam à temperatura de 37°C e pH 8 para ambos os óleos.

Pela Figura 29 é possível verificar que a LGC foi capaz de hidrolisar completamente o óleo de algodão após 80 min, enquanto que para o palmiste uma percentagem de hidrólise de 71% foi alcançada após 180 min. Essa diferença na porcentagem e no tempo de hidrólise pode ser explicado pela diferença da composição de ácidos graxos entre os dois óleos (ver Tabela 1).

O óleo de algodão, assim como o óleo de oliva, possui uma concentração maior de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa do que o palmiste, e uma vez que LGC possui uma maior especificidade para hidrolisar ligações ésteres de ácidos graxos que possuem em sua composição cis-9, ou cis-9,12, esses resultados já eram esperados e estão de acordo com os trabalhos de especificidade realizados para essa mesma enzima (CASTRO et al., 2016).

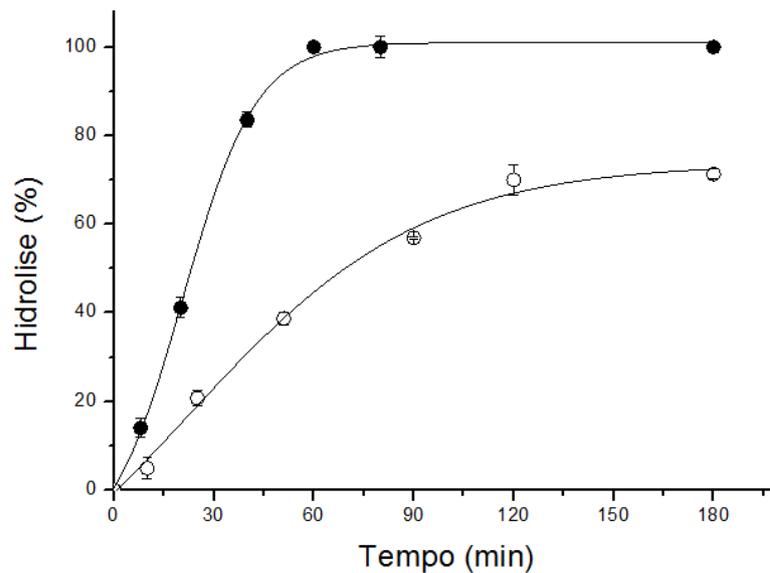


Figura 29 - Perfil da reação de hidrólise para a LGC livre a 37°C e pH 8,0: óleo de palmiste (○); óleo de algodão (■).

Fonte: do Autor.

Comparando-se todos os óleos vegetais avaliados (oliva, algodão e palmiste), pode-se afirmar, que de uma forma geral a reação de hidrólise foi mais favorável quando o óleo de algodão foi usado como substrato, pois 100 % hidrólise foi alcançada em um menor tempo (80 min) do que para o para o óleo de oliva (140 min), devido à especificidade dessa enzima (conforme discutido anteriormente).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a LGC pode ser empregada com sucesso para a obtenção de ácidos graxos concentrados a partir de óleo vegetais que sejam ricos em sua composição, em ácidos graxos de cadeia longa e insaturados.

6 CONCLUSÕES

Os suportes octil-agarose e octil-silica não foram capazes de promover uma purificação da LGC através da imobilização por adsorção via ativação interfacial, tão efetivamente quanto o PHB, sendo necessário a purificação da lipase produzida para o prosseguimento da avaliação da imobilização por diferentes protocolos nos ensaios posteriores.

Dentre os diferentes suportes e procedimentos de imobilização, realizados a baixa carga para a LGC purificada, o MANAE-agarose destacou-se por apresentar a melhor atividade do derivado ($45,4 \pm 0,2$ U/g de suporte) e a melhor atividade de recuperação (22,8 %), sendo, portanto, escolhido para ser avaliado em relação aos parâmetros cinéticos e termodinâmicos na sequência deste trabalho.

A comparação dos parâmetros cinéticos entre a LGC livre e imobilizada (4,5g/g de suporte, a pH 7 e baixa força iônica) mostraram que o derivado ($v_{\text{máx}} = 45,24$ U/mL) foi mais ativo do que a enzima livre ($v_{\text{máx}}=14,13$ U/mL), pois a imobilização propiciou uma redução em torno de 50% na energia necessária para a formação do complexo ES. Os parâmetros termodinâmicos referentes ao estudo de estabilidade térmica mostraram que a imobilização da LGC em MANAE-agarose possibilitou o aumento de sua termoestabilidade e consequentemente do tempo de meia vida, para toda a faixa de temperatura avaliada, com destaque para a incubação a temperatura de 35°C, na qual a lipase imobilizada ($t^{1/2} \approx 138$ h) foi 43 vezes mais estável do que a livre ($t^{1/2} \approx 3$ h).

Na reação de hidrólise do óleo de oliva, catalisada pela LGC livre e imobilizada, 100 % de hidrólise do óleo foi obtido em 120 min, para o derivado, e em 140 min, para a lipase livre. Esse tempo pode ser considerado pequeno, quando comparado à literatura, e o desempenho da LGC na reação de hidrólise se mostrou muito promissor, pois não foi empregado agente emulsificante e a fração de óleo inicial utilizada foi de 0,25. Entretanto, nos ensaios de reciclo para o derivado, verificou-se o desprendimento da enzima do suporte devido à formação de di e mono-glicerídeos ao longo da reação, que atuam como detergentes. Dessa forma, optou-se pelo emprego da LGC livre na reação de hidrólise de outros óleos vegetais (algodão e palmiste).

Dentre esses dois óleos vegetais avaliados, a LGC apresentou uma maior atividade hidrolítica para o substrato óleo de algodão do que quando comparado com o óleo de palmiste, devido à especificidade dessa lipase para esse substrato.

O estudo para a determinação dos valores ótimos de pH e temperatura na reação de hidrólise para a LGC livre mostraram que para todos os substratos empregados (óleos de algodão, oliva e palmiste) o pH ótimo e a temperatura ótima foram, respectivamente, pH 8,0 e

37 °C. E de acordo com os dados cinéticos e termodinâmicos, a LGC necessita de fornecimento de energia para a formação do complexo enzimático (ES), porém, a liberação do produto na fase catalítica ocorre espontaneamente.

Dentre os três óleos vegetais avaliados, de uma forma geral a reação de hidrólise foi mais favorável quando foi utilizado como substrato o óleo de algodão, devido à especificidade desta lipase.

A LGC pode ser empregada com sucesso na reação de hidrólise de óleos vegetais que possuam em sua composição uma maior porcentagem de ácidos graxos insaturados e de cadeia longa, para a obtenção de ácidos graxos concentrados.

7 TRABALHOS FUTUROS

Em vista dos resultados obtidos e com a finalidade de dar sequência nos estudos do presente trabalho, tem-se as seguintes propostas para trabalhos futuros:

- a) Realizar novos estudos com o suporte MANAE-agarose, inter cruzando-o com glutaraldeído a fim de tentar reter a lipase produzida por *Geotrichum candidum* no suporte.
- b) Realizar novos testes de imobilização de enzima em outros suportes que ainda não foram estudados empregando a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, em vista a encontrar melhores rendimentos de imobilização e atividade recuperada para esta enzima.
- c) Utilizar outros óleos vegetais na reação de hidrólise para produção de ácidos graxos concentrados.
- d) Aplicação em outras reações de interesse industrial, catalisadas pela lipase produzida por *Geotrichum candidum*, como reações de esterificação e transesterificação.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406, 2013.
- ALBUQUERQUE, T. L. DE et al. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 865–874, 2016.
- ALVES, M. D. et al. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1–12, 2017.
- ALVES, M. D.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 14–16, 2016.
- ASGHER, M. et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.
- AVELAR, M. H. M. et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 452–458, 2013.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Investigation of deactivation thermodynamics of lipase immobilized on polymeric carrier. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 5, p. 741–757, 2017.
- BAILLARGEON, M. W.; BISTLINE, R. G.; SONNET, P. E. Evaluation of Strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty-acid specificity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 92–96, 1989.
- BASTIDA, A. et al. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486–493, 1998.
- BHATTACHARYYA, M. S.; BANERJEE, U. C. Improvement of carbonyl reductase production of *Geotrichum candidum* for the transformation of 1-acetonaphthone to S(-)-1-(1'-naphthyl) ethanol. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1958–1963, 2007.
- BON E. P. S.; FERRARA M. A.; CORVO M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BRABCOVÁ, J. et al. Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 62–72, 2013.

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

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 77–84, 2004.

BUSTOS-JAIMES, I. et al. Kinetic studies of Gly28:Ser mutant form of *Bacillus pumilus* lipase: Changes in *k_{cat}* and thermal dependence. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 12, p. 2222–2227, 2010.

CAMPRESTRE. Campestre ind. e com. óleos vegetais ltda. **Óleo de algodão refinado – ficha técnica**. Disponível em: <http://www.campestre.com.br/oleos-vegetais/oleo-de-algodao/oleo-de-algodao-refinado-ficha-tecnica/>>. Acesso em: 05 maio 2017.

CARVALHO, N. B.; LIMA, ÁLVARO S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2014.

CASTRO, P. F. et al. Produção seletiva de lipase por *Geotrichum candidum* em fermentação submersa, utilizando óleo de algodão: otimização e caracterização de especificidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 1, 2016, Fortaleza. **Anais...** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2016. 8 p.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D'AVILA et al. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

CHARTON, E.; MACRAE, A. R. Substrate specificities of lipases A and B from *Geotrichum candidum* CMICC 335426. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1123, n. 1, p. 59–64, 1992.

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial application of lipase: a review. **Biopharm Journal**, v. 1, n. 2, p. 41–47, 2015.

COELHO M. A. Z.; SALGADO A. M.; RIBEIRO B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2008.

COLLA, L. M. C. O. R. J. A. V. C. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2012.

CRUZ, J. C. et al. Conformational changes and catalytic competency of hydrolases adsorbing on fumed silica nanoparticles: II. Secondary structure. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 1–10, 2010.

DALLA-VECCHIA, R. et al. Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2677–2682, 2005.

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

DAVID, A. E. et al. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 3, p. 395–407, 2006.

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

DE MORAIS, W. G. et al. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v. 123, p. 26–34, 2016.

DEGUSA S/A. *Basic characteristics of AEROSIL®*. Technical Bulletins Fine Particles, 1993.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 918–927, 2015a.

DOS SANTOS, J. C. S. S. et al. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **Process Biochemistry**, v. 5, n. 45, p. in press, 2015b.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 7, p. 546–550, 1993.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061–1067, 2008.

GUTIÉRREZ-AYESTA, C.; CARELLI, A. A.; FERREIRA, M. L. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1–2, p. 35–43, 2007.

HASAN F.; SHAH A. A.; HAMEED A. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782–798, 2009.

HERNANDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 1, p. 72–78, 2011.

HUNG, T. C. et al. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, n. 1–2, p. 69-78, 2003.

JACOBSEN, T. et al. Production, partial purification, and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 2, p. 90–95, 1989.

JANSON, J. C. **Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2011.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 27 ago. 2014.

KOSUGI, Y.; TANAKA, H.; TOMIZUKA, N. Continuous hydrolysis of oil. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 617–622, 1990.

KRAMER, M. et al. Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* lipase B immobilized on fumed silica. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 80–86, 2010.

KUMAR, D. et al. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 51–61, 2013.

LABCONCO. *Protecting your laboratory environment* LABCONCO. **Dry Evaporators, Concentrators & Cold Traps**. Disponível em: <<http://www.labconco.com/category/dry-evaporators-vacuum-concentrators-cold-traps>>. Acesso em 05 mai. 2017.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.

LAGE, F. A. P. et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56–67, 2016.

LI, S. F.; WU, W. T. Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 1, p. 48–53, jun. 2009.

MALCATA, F. X.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C. H. Use of a lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butteroil. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 8, p. 853–868, 1991.

MALDONADO, R. R. et al. Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147–151, 2012.

MALDONADO, R. R. A review on *Geotrichum* lipases: production, purification, immobilization and applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal**, v. 30, n. 4, p. 439–454, 2017.

MARANGONI, A. G. **Enzyme Kinetics: A Modern Approach**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MENDES, A. A. et al. Immobilization of a commercial lipase from *Penicillium camembertii* (lipase G) by different strategies. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–8, 2011a.

MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint

covalent attachment on aldehyde-resin affinity: application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109–115, 2011b.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011c.

MENDES, A. A. et al. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503–511, 2012.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; DE L.C. GIORDANO, R. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245–251, 2013.

MIRANDA, J. S. et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. v. 251, p. 392–403, 2014.

MORENO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 93, n. 3, p. 357–369, 1994.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 2, p. 57–66, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

OTA, Y.; SAWAMOTO, T.; HASUO, M. Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 11, p. 2497–2499, 2000.

PALOMO, J. M. et al. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447–454, 2005.

PEREIRA, M. G. et al. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561–570, 2015.

PIAZZA, G. et al. Lipolysis of olive oil and tallow in an emulsifier-free two-phase system by the lipase from oat seeds (*Avena sativa* L.). **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 7, p. 487–492, 1989.

PORATH, J.; LAAS, T.; JANSON, J. C. Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. III. rigid agarose gels cross-linked with divinyl sulphone (DVS). **Journal of Chromatography A**, v. 103, n. 1, p. 49–62, 1975

RAMOS, E. Z. et al. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118,

p. 43–51, 2015.

REIS, P. et al. Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. **Comptes Rendus Chimie**, v. 12, n. 1–2, p. 163–170, 2009.

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

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126–131, 2010.

RUEDA, N. et al. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. **RSC Adv.**, v. 5, n. 15, p. 11212–11222, 2015.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 6, p. 717–723, 1987.

SALEEM, M. et al. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized endoglucanase from *Arachniotus citrinus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 849–855, 2005.

SANTOS, K. C. et al. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 462–470, ago. 2013.

SAQIB, A. A. N. et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641–646, maio 2010.

SCHRAG, J. D. et al. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, v. 351, n. 6329, p. 761–764, 1991.

SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. 1.8 Å refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, n. 2, p. 575–591, 1993.

SERRI, N. A.; KAMARUDIN, A. H.; ABDUL RAHAMAN, S. N. Preliminary studies for production of fatty acids from hydrolysis of cooking palm oil using *C. Rugosa* lipase. **Journal of Physical Science**, v. 19, n. 1, p. 79–88, 2008.

SHIMADA, Y. et al. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, n. 2, p. 77–80, 1992.

SHIOMORI, K. et al. Hydrolysis rates of olive oil by lipase in a monodispersed O/W emulsion system using membrane emulsification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 6, p. 552–558, 1995.

SILVA, N. C. A. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 1139–1149, 2014.

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

SONNET, P. E.; MCNEILL, G. P.; JUN, W. Lipase of *Geotrichum candidum* immobilized on silica gel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 12, p. 1421–1423, 1994.

SOUZA, P. M. et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17–21, 2015.

STRÁNSKÝ, K. et al. Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 3, p. 209–216, 2007.

TANI, K.; SUZUKI, Y. Effect of octadecyl-modification on retention when using titania as a support. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 19, n. 17-18, p. 3037–3048, 1996.

TODERO, L. M. et al. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 8, p. 1601–1613, 2015.

TSAI, S. W.; CHIANG, C. Kinetics, mechanism, and time course analysis of lipase-catalyzed hydrolysis of high concentration olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 2, p. 206–211, 1991.

TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; TOMINAGA, Y. Purification, crystallization and some properties of lipase from *Geotrichum candidum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n. 6, p. 1457–1464, 1973.

VESCOVI, V. et al. Lipase-catalyzed production of biodiesel by hydrolysis of waste cooking oil followed by esterification of free fatty acids. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 12, p. 1615–1624, 2016.

VOLPATO, G. et al. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 4, p. 473–478, 2010.

WANG, Y. J. et al. Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 6, p. 628–633, 1988.

WARNER, J. C.; CANNON, A. S.; DYE, K. M. Green chemistry. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 24, n. 7-8, p. 775-799, 2004.

YIĞİTOĞLU, M.; TEMOÇIN, Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 130–135, 2010.

ZAREVÚCKA, M. et al. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 5, p. 481–486, 2005.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 11, p. 1–25, 2016.

APÊNDICES

Os dados dos apêndices a seguir foram utilizados para auxiliar no cálculo de parâmetros envolvidos nas equações correspondentes.

APÊNDICE A – Composição de ácidos graxos dos óleos utilizados neste trabalho.

Ácidos Graxos	Composição (% m/m)		
	Palmiste	Oliva	Algodão
Caprílico (C _{8:0})	4,30	-	-
Cáprico (C _{10:0})	3,50	-	-
Láurico (C _{12:0})	47,2	-	0,20
Mirístico (C _{14:0})	15,6	-	0,80
Palmítico (C _{16:0})	8,60	11,4	23,9
Palmitoleico (C _{16:1})	-	0,65	1,20
Esteárico (C _{18:0})	2,00	2,60	2,70
Oleico (C _{18:1})	15,9	80,6	18,2
Linoleico (C _{18:2})	2,80	4,20	52,5
Linolênico (C _{18:3})	-	0,60	0,40
Eicosanóico (C _{20:0})	-	0,20	0,10
Massa molecular média (g/mol)	222,9	279,6	273,9

Fonte: AVELAR et al., (2013); CAMPESTRE ind. e com. óleos vegetais Ltda.; SANTOS et al., (2013);

APÊNDICE B – Dados para o cálculo da energia de ativação (E_a) para a enzima livre e imobilizada, utilizando-se a equação de Arrhenius.

Temperatura (K)	1/T (K ⁻¹)	LGC+MANAE	LGC livre
		ln (Atividade)	ln (Atividade)
293	0,00341	-	0,693
298	0,00336	3,41543	1,23081
303	0,00330	3,51005	1,805
308	0,00325	3,90822	2,17838
310	0,00323	4,07737	2,24326
313	0,00319	4,13884	2,15455
318	0,00314	4,16558	2,11866
323	0,00310	4,00259	1,93326
328	0,00305	-	1,58842
333	0,0030	3,97744	1,32867
338	0,00296	-	1,05222
343	0,00292	3,72521	0,81359
353	0,00283	3,65739	-

	ln (k)	- E_a/R (K)	R ²
LGC+MANAE	17,33	-4149	0,876
LGC livre	29,74	-8497	0,983

APÊNDICE C – Dados para o ajuste linear de Arrhenius (Estabilidade térmica da LGC livre e imobilizada em MANAE-agarose para o óleo de oliva).

Temperatura (K)	1/T (K ⁻¹)	LGC livre	LGC imobilizada em MANAE-agarose
		ln (k _d)	ln (k _d)
308	0,00325	-5,2785	-6,1658
313	0,00319	-4,1997	-5,2591
318	0,00314	-3,5720	-4,1997
323	0,0031	-2,8302	-2,8630

	ln A	E _d /R (kJ/mol.K.min)	R ²
LGC livre	46,385	-15881,98	0,983
LGC imobilizada em MANAE-agarose	64,472	-21792,42	0,984

APÊNDICE D – Dados para o ajuste linear de Arrhenius (Estabilidade térmica da LGC livre para os óleos de algodão e palmiste).

Temperatura (K)	1/T (K ⁻¹)	óleo de alodão		óleo de palmiste	
		k _d	ln (k _d)	k _d	ln (k _d)
308	0,00325	0,00914	-4,6951	0,00035	-7,9662
313	0,00319	0,01607	-4,1308	0,00282	-5,871
318	0,00314	0,03101	-3,4735	0,00328	-5,7199
323	0,0031	0,049	-3,0159	0,05787	-2,8496

	ln A	E _d /R (kJ/mol.K.min)	R ²
Óleo de algodão	32,11222	-11335,8	0,995
Óleo de palmiste	92,01975	-30789,9	0,855