

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAFAEL MATSUMOTO PEREIRA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
UTILIZAÇÃO DE HIDROGEL DE QUITOSANA E
GLICEROL FOSFATO PARA IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASE DE *RHIZOPUS ORYZAE***

Poços de Caldas/MG

2015

RAFAEL MATSUMOTO PEREIRA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
UTILIZAÇÃO DE HIDROGEL DE QUITOSANA E
GLICEROL FOSFATO PARA IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASE DE *RHIZOPUS ORYZAE***

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Alfenas (Unifal), Campus Poços de Caldas, como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais. Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientadora: Dra Maria Gabriela Nogueira Campos

Co-orientadora: Dra Grazielle Santos Silva Andrade.

Poços de Caldas/MG

2015

P436o Pereira, Rafael Matsumoto.

Obtenção, caracterização e utilização de hidrogel de quitosana e glicerol fosfato para imobilização de lipase de *Rhizopus oryzae* / Rafael Matsumoto Pereira. – Poços de Caldas, 2015.
69 f. -

Orientadora: Maria Gabriela Nogueira Campos.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) -
Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2015.
Bibliografia.

1. Lipase. 2. Quitosana. 3. Enzimas imobilizadas. I. Campos,
Maria Gabriela Nogueira. II. Título.

CDD: 620.192

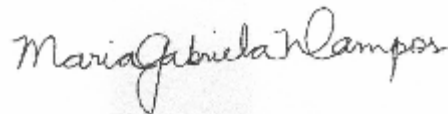
RAFAEL MATSUMOTO PEREIRA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE HIDROGEL
DE QUITOSANA E GLICEROL FOSFATO PARA IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASE DE *Rhizopus oryzae***

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

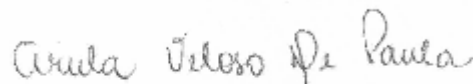
Área de Concentração:
Desenvolvimento, Caracterização e
Aplicação de Materiais.

Aprovada em: 26 de junho de 2015.



Profa. Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Instituição: Universidade Estadual Paulista - UNESP



Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

Instituição: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Dedico a meus pais,
professores e amigos que
me apoiaram na
realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, os quais sempre fizeram o possível e impossível para que eu tivesse uma educação de qualidade e sempre apoiaram meus sonhos.

À minha orientadora Prof^a Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos que ao longo dos anos de trabalho não mediu esforços para me ajudar sempre. Uma pessoa incrível, com coração de ouro e que sempre me recepcionou com calma e um sorriso, mesmo quando eu chegava desesperado com algum problema, e tendo sempre uma palavra amiga, inclusive quando eu errava. Você me ensinou a ser um profissional melhor e também a crescer como ser humano. Não existem palavras que expressem a minha gratidão e a felicidade por saber que além de ter tido uma ótima orientadora, tenho uma amiga para a vida a toda.

À minha co-orientadora Prof^a Dra. Grazielle Santos Silva Andrade que aceitou o convite para colaborar nesse trabalho. Uma pessoa que me ensinou que quase tudo na vida é conquistado com muita luta e dedicação e nesses anos de convívio se mostrou possuidora de um coração gigante, sempre preocupada e amiga. Hoje, além do respeito eterno como minha professora e orientadora, tenho a alegria de tê-la como minha amiga.

À Mayara da Mota Matos, minha amiga e secretária da Pós Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais por sempre estar à disposição para ajudar da melhor forma possível com o que estava ao seu alcance.

À Unifal e ao programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais por me possibilitarem desenvolver este trabalho.

Aos técnicos, Aline, Gustavo, Flávia e Ana Paula, Luana e João do Laboratório de Graduação do Instituto de Ciência e Tecnologia pelo suporte, paciência e ensinamentos sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

Aos Prof^oDr. Gael Yves Poirier e Dra. Carolina Dakuzaku Freschi pelo auxílio nas análises térmicas.

Aos Prof^oDr. Roberto Bertholdo e minha amiga de mestrado Carmen Greice Renda pelo auxílio nas análises de FTIR.

À Profª Dra Ariela Veloso de Paula pelos reagentes e ajuda na realização da análise de teor de proteína.

Ao LME-IQ do Campus de Unesp em Araraquara pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À todos os meus amigos, em especial a Karine e o José Tadeu, que me apoiaram durante esse trabalho e minha vida acadêmica.

RESUMO

A preocupação com o desenvolvimento de técnicas menos agressivas em termos ambientais contribuindo para o desenvolvimento sustentável, levou a utilização de tecnologia enzimática e materiais biodegradáveis como uma rota alternativa. A quitosana é um polímero atóxico, biodegradável e biocompatível proveniente da desacetilação da quitina, subproduto da indústria pesqueira. Uma de suas aplicações é como suporte para a imobilização de biocatalisadores com o intuito de melhorar algumas características, como estabilidade e reutilização. A imobilização pode ocorrer por diversas técnicas, não existindo um método único que abrange todo e qualquer caso. Neste contexto, esse trabalho estudou a viabilidade da utilização de um hidrogel à base de quitosana para imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P). Para isso foi realizada a imobilização da lipase por adsorção física e por ligação covalente em hidrogel de quitosana ativado com glutaraldeído. A fim de verificar modificações químicas significativas e a perda de massa das amostras em função da temperatura, os materiais foram submetidos às técnicas de termogravimetria (TG) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A massa residual foi de 30% para a enzima livre e de 45% para as enzimas imobilizadas e os espectros de FTIR comprovaram a imobilização devido a mudanças ocorridas em algumas bandas de absorção. A análise da morfologia da superfície do suporte foi realizada através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura que evidenciaram uma estrutura mais densa e menos porosa após a reticulação do hidrogel. A atividade hidrolítica da lipase imobilizada foi de 406,30 U/g para a imobilização por adsorção física; 439,82 U/g para a imobilização por ligação covalente. Os parâmetros cinéticos k_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados e não houve diferença significativa no valor de k_m para a ambas as lipase imobilizada já o valor de $V_{m\acute{a}x}$ sofreu uma queda para ambas as imobilizações indicando uma possível inibição não competitiva. A estabilidade térmica e de estocagem foram avaliadas e foi observada uma melhora na estabilidade térmica após 150 minutos e a atividade hidrolítica de todos os materiais não apresentaram perda significativa após 120 dias. Os biocatalisadores foram ainda caracterizados quanto a atividade ótima de atuação em função da temperatura e pH utilizando a técnica de planejamento de experimentos (delineamento composto rotacional 2^2 com três repetições no ponto central). Os resultados encontrados mostraram que há uma variação na temperatura e pH ótimo após a imobilização, sendo encontrado valores máximos de 839,76 U/g para a lipase livre (pH 7,5 a 36°C), 574,18 U/g para a lipase imobilizada por adsorção física (pH 7,5 a 50°C) e 3572,44 U/g para a lipase imobilizada por ligação covalente (pH 8,5 60°C). A partir dos resultados obtidos, verificou-se a potencialidade da utilização de hidrogel como suporte de imobilização da lipase.

Palavras-chave: Lipase. Quitosana. Imobilização. Hidrogel.

ABSTRACT

The concern with the development of less aggressive techniques for the environment contributing to sustainable development, has led to use of enzyme technology and biodegradable materials as an alternative route. Chitosan is a polymer nontoxic, biodegradable and biocompatible obtained from the deacetylation of chitin by-product of the fishing industry. One of the applications of chitosan is as a support for the immobilization of biocatalysts in order to improve certain characteristics, such as stability and reusability. Immobilization may occur for several ways, with no single method that covers every case. In this context, this study investigated the viability of using a chitosan-based hydrogel to immobilization of lipase *Rhizopus oryzae* (L036P). To do this was made lipase immobilization by physical adsorption and covalent linking of chitosan hydrogel activated with glutaraldehyde. In order to verify significant chemical modifications and the mass loss of samples as a function of temperature, the materials were subjected to thermogravimetric analysis (TG), and infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR). The residual mass was 30% for the free enzyme and 45% for immobilized enzymes and the infrared spectra confirmed the immobilization due to changes in absorption in certain bands. The analysis of the support surface morphology was performed by images obtained by scanning electron microscopy which showed a denser and less porous structure after crosslinking of the hydrogel. The hydrolytic activity of the immobilized lipase was 406.30 U / g for the immobilization by physical adsorption and 439.82 U / g for the immobilization by covalent attachment. Kinetic parameters (k_m and $V_{m\acute{a}x}$) were determined and there was no difference in the amount of k_m for both immobilized lipase. The $V_{m\acute{a}x}$ value has fallen for both immobilizations indicating a possible non competitive inhibition. The thermal stability and storage were evaluated and it was observed an improvement in thermal stability after 150 minutes and the hydrolytic activity of all the materials showed no significant loss after 120 days. The biocatalysts were further characterized as the optimal activity of action as function of temperature and pH using the experimental design technique through rotational composite design with three replications 2^2 the center point. The results showed that there is a variation in optimal temperature and pH after immobilization being found maximum values of 839.76 U / g for the free lipase (pH 7.5 and 36 °C), 574.18 U / g for lipase immobilized by physical adsorption (pH 7.5 and 50 °C) and 3572.44 U / g to covalently immobilized lipase (pH 8.5 and 60 °C). From the results obtained, it was verified the potential use of hydrogel as lipase immobilization support.

Keywords: Lipase. Chitosan. Immobilization. Hydrogel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplos de reações catalisadas por lipase	18
Figura 2 - Diferentes métodos de imobilização de enzimas.....	21
Figura 3 - Estrutura da Quitosana	25
Figura 4 - Estrutura do glicerol fosfato	26
Figura 5 - Hidrogel em suas diferentes etapas: (a) Antes de autoclavar; (b) Após autoclavar; (c) Após liofilização; (d) Hidrogel em pó.	37
Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura do hidrogel quitosana-glicerol fosfato (em pó liofilizado).....	38
Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura do hidrogel reticulado com glutaraldeído 25%	38
Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura da lipase imobilizada por ADS.....	38
Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura da lipase imobilizada por LC.....	39
Figura 10 - Espectro de infravermelho do hidrogel, da lipase livre, da lipase imobilizada por ADS, do hidrogel ativado com glutaraldeído e da lipase imobilizada por LC.....	41
Figura 11 - Espectro de infravermelho do hidrogel e hidrogel reticulado com glutaraldeído. .	41
Figura 12- Curva TG e DTG.....	43
Figura 13 - Atividade da lipase livre em função da concentração de azeite de oliva	46
Figura 14 - Atividade da lipase imobilizada por ADS e LC em função da concentração de azeite de oliva.....	46
Figura 15 - Atividade hidrolítica residual da lipase livre após diferentes tempos de incubação sob temperatura de 60°C.....	49
Figura 16 - Atividade hidrolítica residual da lipase imobilizada por ADS e LC após diferentes tempos de incubação sob temperatura de 60°C	49
Figura 17 - Superfície de resposta descrita pela Equação 2 que representa a atividade hidrolítica da lipase livre em função do pH e temperatura.	54
Figura 18 - Superfície de resposta descrita pela Equação 6 que representa a atividade hidrolítica da lipase imobilizada por ADS em função do pH e temperatura.....	56
Figura 19 - Superfície de resposta descrita pela Equação 4 que representa a atividade hidrolítica da lipase imobilizada por ligação covalente em função do pH e temperatura.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de aplicações de lipase na indústria.	19
Tabela 2 - Comparação de algumas características dos principais métodos de imobilização.	20
Tabela 3 - Exemplos de trabalhos que utilizaram a imobilização por ADS da lipase de fontes microbianas diferentes em vários suportes.....	22
Tabela 4 - Exemplos de trabalhos que utilizaram a imobilização por LC da lipase de fontes microbianas diferentes em vários suportes e grupos ativadores.	23
Tabela 5 - Aplicação da quitosana em diversas áreas industriais e seus respectivos setores.	26
Tabela 6 - Exemplos de aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas com seus respectivos métodos e aplicação industrial	27
Tabela 7 - Valores de pH e temperatura encontrados para o delineamento	35
Tabela 8 - Valores de pH e temperatura encontrados para o delineamento linear.	35
Tabela 9 - Teor de umidade e atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada	44
Tabela 10 - Atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em diferentes concentrações de azeite de azeite de oliva.....	45
Tabela 11 - Valores de k_m e V_{max} para a lipase livre e imobilizada	47
Tabela 12 - Atividade hidrolítica residual da lipase livre e imobilizada após a incubação numa temperatura de 60°C em diferentes valores de tempo.	48
Tabela 13 - Constante de inativação térmica (k_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a lipase livre e imobilizada por ADS e LC.....	50
Tabela 14 - Valores de atividade hidrolítica obtidos mensalmente	51
Tabela 15 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo o planejamento composto central 2^2 estrela rotacional para estudo da influência do pH e temperatura na atividade hidrolítica.	51
Tabela 16 - Estimativo dos efeitos das variáveis, erro padrão e o valor de p para a atividade hidrolítica da lipase livre usando planejamento central 2^2 estrela rotacional.....	53
Tabela 17 - Análise da Variância (ANOVA) para regressão do modelo que representa a atividade hidrolítica em função da temperatura e pH da lipase livre usando planejamento central 2^2 estrela rotacional.	54
Tabela 18 - Estimativo dos efeitos das variáveis, erro padrão e o valor de p para a atividade hidrolítica da lipase imobilizada por ADS usando planejamento linear.	55

Tabela 19 - Análise da Variância (ANOVA) para regressão do modelo que representa a atividade hidrolítica em função da temperatura e pH da lipase imobilizada por ADS usando planejamento linear.	56
Tabela 20 - Estimativo dos efeitos das variáveis, erro padrão e o valor de p para a atividade hidrolítica da lipase imobilizada por LC usando planejamento central 2 ² estrela rotacional.....	57
Tabela 21 - Análise da Variância (ANOVA) para regressão do modelo que representa a atividade hidrolítica em função da temperatura e pH da lipase imobilizada por ligação covalente usando planejamento central 2 ² estrela rotacional.....	58
Tabela 22 - Atividade hidrolítica da enzima livre, imobilizada por ADS e LC nas melhores condições encontradas pelo delineamento	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADS	- Adsorção Física
DSC	- Calorimetria Diferencial de Varredura
EPI	- Epicloridrina
GLI	- Glicidol
GLU	- Glutaraldeído
IUBMB	- União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
LC	- Ligação Covalente
LTL	- <i>Thermocyces lanuginosus</i>
PHB	- Poli-hidróxibutirato
PHBV	- Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)
TG	- Termogravimetria
TNBS	- Ácido 2,4,6 trinitrobenzenossulfônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	DESENVOLVIMENTO	16
2.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1.1	Lipase	16
2.1.2	Imobilização de enzimas	20
2.1.2.1	Imobilização por adsorção física (ADS)	21
2.1.2.2	Imobilização por ligação covalente (LC)	22
2.1.2.3	Suportes de imobilização	24
2.1.2.3.1	Quitosana	24
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	28
2.2.1	Material	28
2.2.2	Metodologia experimental	29
2.2.2.1	Preparação do hidrogel de quitosana	29
2.2.2.2	Preparação da lipase imobilizadas	29
2.2.2.2.1	Imobilização por adsorção física	29
2.2.2.2.2	Imobilização por ligação covalente	30
2.2.2.3	Caracterização do suporte e do derivado imobilizado	30
2.2.2.3.1	Análise morfológica	30
2.2.2.3.2	Análise química	31
2.2.2.3.3	Análise Térmica	31
2.2.2.3.4	Determinação do teor de umidade da enzima livre e imobilizada	31
2.2.2.3.5	Rendimento de Imobilização (n)	32
2.2.2.3.6	Teor de Proteína	32
2.2.2.3.7	Determinação da atividade hidrolítica	33
2.2.2.3.8	Determinação dos parâmetros cinéticos	33
2.2.2.3.9	Estabilidade Térmica	34
2.2.2.3.10	Estabilidade ao Período de Estocagem	34
2.2.2.3.11	Delineamento Experimental	35
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
2.3.1	Hidrogel de Quitosana	36
2.3.2	Caracterização Morfológica	37
2.3.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	39

2.3.4	Termogravimetria (TG)	42
2.3.5	Imobilização da lipase	44
2.3.5	Parâmetros cinéticos	45
2.3.6	Estabilidade Térmica	48
2.3.7	Estabilidade ao período de estocagem	50
2.3.8	Delineamento experimental	51
2.3.8.1	Enzima Livre.....	52
2.3.8.2	Adsorção Física.....	55
2.3.8.3	Ligação Covalente.....	57
2.3.8.4	Validação.....	59
3	CONCLUSÃO	60
4	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICES	68

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o grande desafio industrial tem sido o desenvolvimento de produtos e processos menos agressivos em termos ambientais, contribuindo para o desenvolvimento de um modo sustentável. Nesse sentido, a tecnologia enzimática e a utilização de materiais biodegradáveis vêm sendo apontada como uma rota alternativa, que oferece vantagens necessárias para um processo tecnologicamente limpo (ANTCZAK et al., 2009).

Os polímeros são uma classe de material que está sendo bastante estudada por apresentar características favoráveis como variedades de formas físicas e estruturas químicas e que podem ser combinadas, tais como os polímeros sintéticos (resinas acrílicas), além de possuírem baixo custo e serem degradáveis, como os polímeros naturais (agarose e hidrogéis de quitosana) (MENDES et al., 2011a).

A quitosana é um polímero proveniente da desacetilação da quitina, um polissacarídeo amplamente encontrado na natureza, atóxico, biodegradável, biocompatível e produzido por fontes naturais renováveis. A quitina é um subproduto da indústria pesqueira e sua reutilização é muito importante do ponto de vista ambiental e econômico, pois elimina este resíduo e reduz os custos da indústria da pesca com o descarte. Uma das possíveis aplicações da quitosana é como suporte para imobilização de biocatalisadores para aplicação industrial (DIAS et al., 2013).

As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases e fitases. São três seguimentos principais que utilizam os biocatalisadores: as indústrias de alimentos (produção de xarope e compostos aromatizantes); enzimas técnicas (formulação de detergentes, produção de papel e celulose) e produção de ração animal (MESSIAS et al., 2011).

Apesar dos grandes benefícios da utilização de enzimas, a sua aplicação industrial ainda encontra alguns obstáculos que inviabilizam seu emprego em larga escala, como por exemplo a sua solubilidade em água que resulta muitas vezes na contaminação do produto, exigindo assim uma etapa de separação do produto final das impurezas através de técnicas de purificação que além de gerar custo, pode vir a inutilizar a enzima (MANZANO; IGARZABAL, 2011). Uma forma encontrada para contornar esse problema é utilizar a técnica de imobilização que estabiliza a enzima, permite o seu reuso e possibilita a utilização da enzima em processos (DALLA-

VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; DANDAVATE; KEHARIA; MADAMWAR, 2011).

A imobilização pode ser feita utilizando diferentes suportes tanto orgânicos quanto inorgânicos e por diferentes métodos, como por exemplo, a adsorção física (ADS), encapsulação ou ligação covalente (LC), sendo o primeiro o mais empregado industrialmente por ter baixo custo (AMORIM et al. 2003).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade de um hidrogel à base de quitosana para a imobilização por adsorção física e por ligação covalente da lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P).

2 DESENVOLVIMENTO

Nesta etapa do trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica sobre os assuntos relevantes ao trabalho e também à apresentação dos materiais e métodos utilizados para a realização do mesmo.

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção são apresentadas os fundamentos teóricos relevantes e utilizados para o desenvolvimento do trabalho. Ela foi dividida em dois itens principais: lipase e imobilização de lipase.

2.1.1 Lipase

São enzimas nomeadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) como triacilglicerol acilhidrolase (EC 3.1.1.3). A primeira lipase estudada (origem animal) foi descoberta em 1856 por Claude Bernard e utilizada como auxiliar digestivo para o consumo humano, porém as dificuldades de obtenção levaram ao estudo de outras fontes dessa enzima (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Atualmente podem ser encontradas na natureza a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Com os avanços tecnológicos, as enzimas de origem microbianas passaram a ser mais vantajosas comercialmente por apresentarem menor custo de produção, possibilidades de produção em larga escala e propriedades enzimáticas favoráveis, como especificidade (fator crucial na determinação da aplicação), estabilidade térmica (diferente para bactérias e fungos), temperatura e pH de atuação e habilidade de catalisar reações de síntese na presença de solventes orgânicos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Muitos micro-organismos podem produzir diferentes lipases conforme as condições de cultivos em que se encontram (pH, composição do meio de cultura, temperatura, tempo de cultivo). Um estudo realizado por Sharma, Chisti e Banerjee (2001) listou 109 diferentes espécies capazes de produzir lipase, sendo que 47 são

bactérias, principalmente dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, 42 são fungos e 20 são leveduras. Os fungos filamentosos são considerados os melhores produtores de lipase, sendo as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geothrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* os maiores produtores, assim como a levedura *Candida rugosa*. (CARDENAS et al., 2001; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A lipase de *Rhizopus oryzae* possui massa molar de 28-67 kDa, estabilidade entre pH 3 à 8 e são compostas por diferentes isoformas com pontos isoelétricos distintos (SAXENA et al., 2003). As espécies do fungo *Rhizopus* são utilizadas comumente no setor alimentício e em indústrias químicas, como por exemplo, para processamento de óleos, produção de agentes surfactantes e produtos farmacêuticos enantiomericamente puros (KHARRAT et al., 2011; ODA et al., 2003; SAXENA et al., 2003).

As lipases juntamente com as esterases constituem o grupo de enzimas ligado à hidrólise de lipídios, ou seja, elas hidrolisam óleos e gorduras em ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos. Apesar de fazerem parte do mesmo grupo, a lipase possui o diferencial de agir apenas na interface óleo/água (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998; REETZ, 2002).

A função natural da lipase é hidrolisar as ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água, porém elas também são capazes de catalisar reações contrárias desde que haja escassez de água. (GHAMGUI et al. 2007; KARRA-CHÂABOUNI et al., 2008; OLIVEIRA; ALVES; CASTRO, 2000). São exemplos dessas reações, a esterificação e transesterificação. (PAQUES; MACEDO, 2006), como é mostrado na Figura 1.

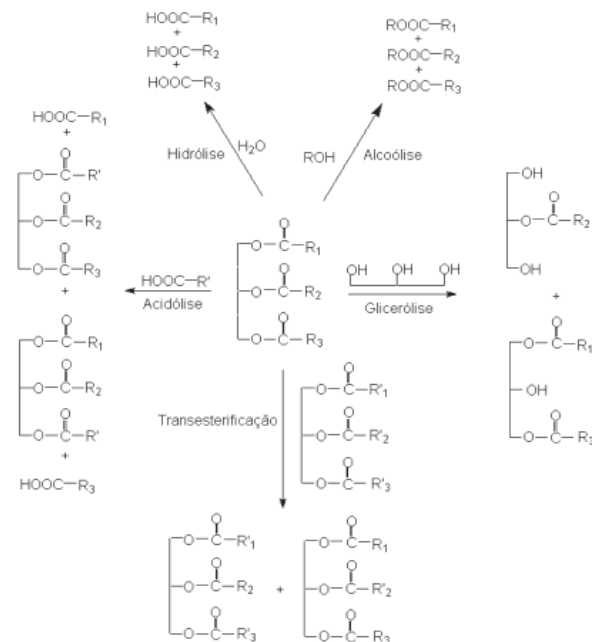


Figura 1 - Exemplos de reações catalisadas por lipase
 Fonte: CASTRO et al. (2004, p. 149)

Toda e qualquer lipase catalisa os mesmos tipos de reações, porém o desempenho de cada uma é diferente mesmo que sejam submetidas às mesmas condições (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). Elas são divididas em dois grupos principais:

a) Lipases com especificidade posicional que são subdividas em:

- Lipases inespecíficas: hidrolisam qualquer ácido graxo independente da posição (CASTRO et al. 2004; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).
- Lipases 1,3 específicas: catalisam apenas os ácidos graxos localizados nas posições 1 e 3 da molécula (CASTRO et al. 2004; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).
- Lipase ácido graxo específico: atuam especificamente em ácidos graxos em função do tamanho de cadeia e/ou insaturação (CASTRO et al., 2004; PAQUES; MACEDO, 2006).

b) Lipases com especificidade estéreo-química: atuam sobre um determinado tipo de isômero (CASTRO et al. 2004; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

A lipase é uma enzima versátil e por isso diversas fontes são estudadas para serem aplicadas em diversos setores industriais, como por exemplo, o setor alimentício, de detergentes, farmacêutico, têxtil, cosmético, entre outros (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Os principais setores que utilizam essa enzima são setor alimentício e químico (Tabela 1).

Tabela 1 - Exemplos de aplicações de lipase na indústria.

Setor	Área	Efeito	Produto
Alimentício	Laticínio	Hidrólise da gordura do leite.	Agente aromatizante para produtos lácteos
	Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos.	Bebidas alcoólicas (vinho e outras).
	Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos.	Maionese, molhos e cremes.
	Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais; hidrólise de óleos (ácidos graxos), diacilglicerol	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
Químico	Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Gorduras
	Analítico	Análise de triacilglicerol no sangue	Diagnostico
	Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
	Curtume	Remoção de gorduras das peles de animais.	Produtos de couro

Fonte: SANTOS (2012, p. 12)

2.1.2 Imobilização de enzimas

As enzimas livres podem sofrer inativação por fatores químicos, físicos e biológicos. Além disso, possuem elevado custo de obtenção, baixa estabilidade e difícil reutilização. Por isso, para que atuem de forma mais eficiente em um processo, fez-se necessário o desenvolvimento de procedimento para proteger as enzimas da interação com o solvente (etapa na qual ocorre normalmente a inativação e solubilização) (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENONCINI et al., 2009). A imobilização, que consiste em fixar a enzima de interesse em um suporte para minimizar as perdas de atividade catalítica, aumenta estabilidade das enzimas (pH e temperatura) e facilita sua recuperação e reutilização (possibilita a utilização da enzima em processos contínuos) sem alterar estruturalmente o biocatalisador. (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; KARRA-CHÂABOUNI et al., 2008).

Não existe um método de imobilização padrão para todos os tipos de enzimas, é preciso levar em consideração fatores como: suporte, tipo de ligação entre suporte e enzima, composição química da enzima, propriedades do substrato e do produto de interesse e condições de uso do sistema (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011a).

Na literatura são encontrados vários trabalhos utilizando dois métodos principais: a imobilização por ligação (adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC)) e por encapsulamento (em matriz ou membrana), como é mostrada na Figura 2. Já a Tabela 2 apresenta uma comparação de algumas características desses métodos.

Tabela 2 - Comparação de algumas características dos principais métodos de imobilização.

Características	ADS	LC	Encapsulamento
Dificuldade de preparação	Simples	Difícil	Difícil
Força da Ligação	Fraca	Forte	Intermediária
Atividade enzimática	Intermediária	Alta	Baixa
Regeneração do Suporte	Possível	Rara	Impossível
Custo de imobilização	Baixo	Alto	Intermediário
Estabilidade	Baixa	Alto	Alta
Aplicabilidade Geral	Sim	Não	Sim

Fonte: Do autor

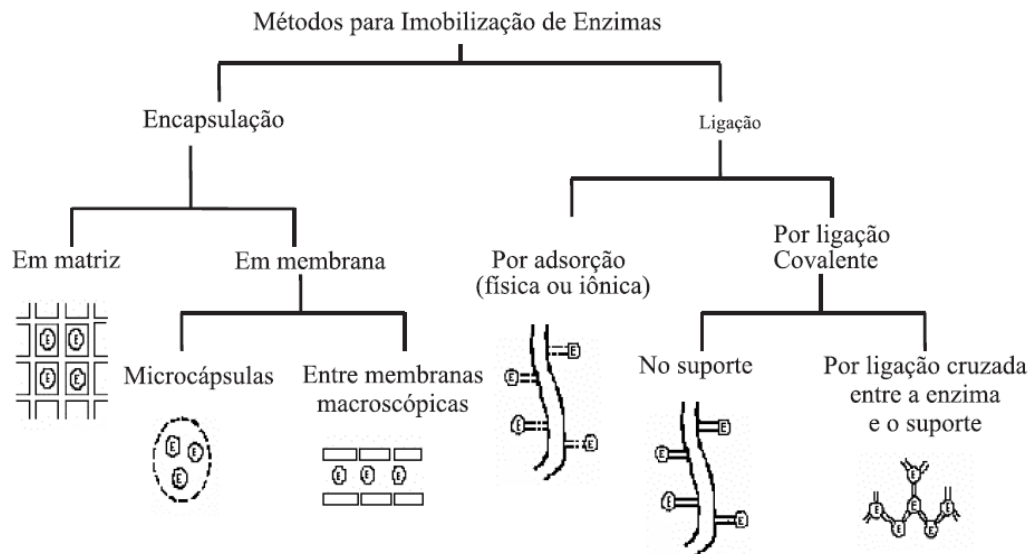


Figura 2 - Diferentes métodos de imobilização de enzimas
 Fonte: DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI (2004, p. 624)

2.1.2.1 Imobilização por adsorção física (ADS)

O processo de adsorção física é o método mais utilizado por ser simples, baixo custo, não ser necessária a ativação do suporte e possibilitar a regeneração da matriz utilizada. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia tais como van der Waals ou hidrofóbicas, iônicas, etc. Esse método depende de fatores como tamanho da enzima a ser adsorvida, área superficial do adsorvente, porosidade (aumenta a área superficial do suporte e conseqüentemente de interação suporte/enzima) e tamanho do poro. No entanto, possui a desvantagem de sofrer dessorção devido às variações de temperatura, pH e força iônica. Vários materiais podem ser usados como suporte e a escolha depende de propriedades tais como estabilidade e capacidade de adsorção. Alguns exemplos de suportes frequentemente utilizados são o polietileno, polipirileno, resina sintética, entre outros (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011a). A Tabela 3 mostra alguns estudos que realizaram a imobilização de duas fontes microbianas diferentes em vários suportes pelo método da ADS.

Tabela 3 - Exemplos de trabalhos que utilizaram a imobilização por ADS da lipase de fontes microbianas diferentes em vários suportes.

Fonte	Suporte	Referência
	Octadecil-sepabeads	Palomo et al. (2002)
<i>Candida Antarctica</i> (CALB)	Nanoparticula de PHBV	Fernandes et al. (2014)
	Octil-agarose	Mendes (2009)
	Hexil-toyopearl	
	Octadecil-sepabeads	
<i>Thermocycles</i> <i>lanuginosus</i> (LTL)	Octil-agarose	Mendes (2009)
	Hexil-toyopearl	
	Octadecil-sepabeads	
<i>Ryizopus oryzae</i>	CaCO ₃	Ghamgui (2007)
	Fibras de celulose	Karra-châabouni (2008)
	Aerogéis de silica	Kharrat (2011)

Fonte: Do autor

2.1.2.2 Imobilização por ligação covalente (LC)

O método de ligação covalente baseia-se na ativação do suporte com algum grupo reativo, como por exemplo epícloridrina, que interagem com os grupos nucleofílicos da enzima formando ligação covalente ou ligações cruzadas. A ligação formada neste método é mais estável (mais resistente a variação de pH, temperatura, influencia do solvente) do que a imobilização por adsorção física e evita a ocorrência da dessorção. Porém é um método mais complexo e possui um custo mais elevado do que a imobilização por adsorção física (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011a). Na Tabela 4 encontram-se alguns estudos envolvendo imobilização de lipases de diferentes fontes microbianas em vários suportes com diferentes grupos ativadores.

Tabela 4 - Exemplos de trabalhos que utilizaram a imobilização por LC da lipase de fontes microbianas diferentes em vários suportes e grupos ativadores.

Fonte	Suporte	Grupo Ativador	Referência
<i>Thermocycles lanuginosus</i> (LTL)	Bagaço de cana-de-açúcar	Glicidol (GLI) Epicloridrina (EPI) Glutaraldeído (GLU)	Mendes, Castro, Giordano (2013)
	Poli-hidróxibutirato (PHB)		
	Quitosana-alginato-laurinaldeído		
	Quitosana-alginato-ácido 2,4,6 trinitrobenzenossulfônico (TNBS)		
<i>Candida cylindraceae</i>	Filme de quitosana	Glutaraldeído (GLU)	Amorim et al. (2003)
<i>Candida rugosa</i>	Matriz híbrida SiO ₂ -quitosana	Epicloridrina (EPI)	Simões et al. (2010)
<i>Candida rugosa</i>	Eupergit® C	Oxirano Glutaraldeído Periodato	Knezevic et al. (2006)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Sílica gel	Glutaraldeído (GLU)	Lee et al. (2011)
	Eupergit® C Lewatit VP OC 1600		Nunes et al. (2012)
	Accurel MP 1000 Eupergit® C Lewatit VP OC 1600		Tecelão et al. (2012)

Fonte: Do autor

2.1.2.3 Suportes de imobilização

A escolha do tipo do suporte assim como acontece na escolha do método de imobilização deve ser feita caso a caso, não existindo um suporte universal. Portanto, faz-se necessário um estudo para determinar qual é o melhor suporte com base na enzima que se deseja confinar. O melhor suporte para a situação é aquele que apresentar maior porcentagem de retenção de atividade. Quão grande é essa porcentagem dependerá basicamente de dois fatores: as características peculiares do material e das condições de uso do sistema imobilizado (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011a).

O material escolhido deve ser facilmente encontrado, estar presente na natureza em abundância, ter baixo custo, ser de fácil operação, não ser tóxico para a enzima, ter alta resistência mecânica e passivo de regeneração. Outras características que devem ser analisadas são: tamanho da área superficial, permeabilidade, insolubilidade, morfologia e composição, natureza hidrofílica, e resistência ao ataque microbiano (MENDES et al., 2011a).

Na literatura, são citados vários materiais que podem ser utilizados como suporte, podendo ser classificados quanto a sua morfologia em materiais porosos, não porosos ou geliformes.

Uma classe de material com interessantes propriedades para aplicação como suportes são os polímeros. Os polímeros sintéticos (resinas acrílicas) apresentam variedade de forma física e estrutura química e podem ser combinadas para formar um suporte mais eficiente. Já os polímeros naturais (agarose e quitosana) apresentam baixo custo e são degradáveis (MENDES et al., 2011b).

2.1.2.3.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo cuja estrutura é formada por uma ligação glicosídica entre unidades de $\beta(1,4)$ -2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e $\beta(1,4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose. É comumente obtida como produto da reação de desacetilação da quitina. Esse processo é muito importante do ponto de vista ambiental e econômico, visto que a grande parte da quitina utilizada para obtenção

desse material é proveniente da carapaça de crustáceos que é um rejeito da indústria pesqueira. A produção de quitosana a partir de quitina permite a utilização de um subproduto da indústria pesqueira, reduzindo o impacto ambiental e as despesas com a descarte desse material (DIAS et al., 2013, SIMÕES et al., 2010).

Os primeiros relatos sobre quitosana foram feitos por Rouget em 1859, porém até o início do século XX, houve confusão entre quitina, quitosana e celulose devido às estruturas semelhantes (celulose tem um grupo hidroxila no carbono 2 do anel glicopiranosídeo enquanto a quitosana tem um grupo amino). Somente em 1970 percebeu-se o potencial tanto da quitina como da quitosana para aplicações em diversos setores e iniciou-se sua produção industrial no Japão (DIAS et al., 2013).

A estrutura da quitosana apresenta três diferentes grupos funcionais, eles são: um grupo hidroxil primário, um grupo hidroxil secundário e um grupo amino, como pode ser visto na Figura 3 (DIAS et al., 2013). A presença do grupo amino (NH_2) na quitosana na posição de uma das hidroxilas (OH) da celulose permite que em meio ácido, haja a formação de um polímero catiônico devido à protonação do grupo amino, garantindo propriedades especiais que fazem com quem esse polímero se diferencie dos outros (AZEVEDO, 2007; DIAS et al., 2013).

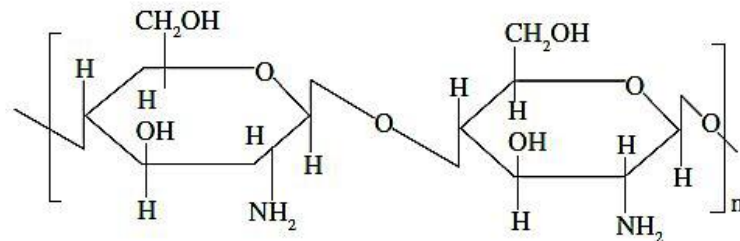


Figura 3 - Estrutura da Quitosana
Fonte: DIAS et al. (2013, p. 186)

O hidrogel é uma das conformações da quitosana, obtido pela adição de uma base na solução de quitosana em ácido diluído. Por definição são redes poliméricas tridimensionais que possuem a capacidade de absorver uma quantidade de água ou fluido biológico consideravelmente grande sem dissolver-se (HAMDINEA et al., 2005).

O glicerol fosfato dissódico (Figura 4) é um sal básico que pode ser utilizado na preparação do hidrogéis. Ele tampona o hidrogel à base de quitosana, mantendo o pH da entre 7,0 e 7,4 e controla as interações hidrofóbicas e as ligações de

hidrogênio (CHENITE, 2000). Esse sal também impede a agregação das cadeias de quitosana, o que permite a liberação de macromoléculas (enzimas, proteínas, etc) seja prolongada (WU; SU; MA, 2006).

A formação sistemática do hidrogel de quitosana e glicerol fosfato ocorre após o término da adição da base que faz com que o pH até então estava em próximo de 1,0 atinja um pH aproximadamente de 6,2 com a desprotonação dos grupos amino da quitosana, removendo assim a repulsão inter cadeias devido às forças eletrostáticas, possibilitando então a ligação de hidrogênio e a interação hidrofóbica entre as cadeias (CHENITE et al., 2001; JAEPYOUNG et al., 2006). O hidrogel de quitosana – glicerol fosfato apresenta características interessantes, tais como: expansibilidade, cinética de adsorção, permeabilidade seletiva de soluto e baixa tensão interfacial (DIAS et al., 2013).

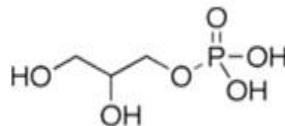


Figura 4 - Estrutura do glicerol fosfato
Fonte: DIAS et al. 2013

A quitosana em suas mais variadas formas é importante tanto comercial como ambientalmente, pois é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável (DIAS et al. 2013). A Tabela 5 mostra a aplicação da quitosana em diversos industriais.

Tabela 5 - Aplicação da quitosana em diversas áreas industriais e seus respectivos setores.

Área	Utilização
Indústria de Alimentos	Aditivos alimentares
	Nutrição animal
Farmacêutica	Agentes cicatrizantes
	Liberação controlada de fármacos
Biomédica	Biomembranas artificiais
	Sutura cirúrgica
Biotecnologia	Imobilização de enzimas
	Separação de proteínas

Na área biotecnológica, a utilização de quitosana em suas diferentes formas para imobilização de enzimas vem sendo muito estudada, sendo possível encontrar na literatura diversos trabalhos, conforme apresentados na Tabela 6, que utilizam esse material como suporte para imobilização.

Tabela 6 - Exemplos de aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas com seus respectivos métodos e aplicação industrial.

Enzima	Suporte	Método	Aplicação	Referências
Alinase	Hidrogel modificado com anidrido succínico	LC	Produção da alicina	Zhou e Wang (2009)
L-Arabinose isomerase	Partículas de hidrogel	Encapsulação	Produção semicontínua de L-ribulose	Zhang, Prabhu e Lee (2009)
Celulase	Polieletrólito de quitosana-alginato	LC	Produção de etanol	Mendes (2009)
Bromelina	Nanopartículas de hidrogel de carboximetil-quitosana modificado com ácido linoleico	ADS	Hidrólise de caseína	Tan et al. (2008)
Catalase	Hidrogel reticulado com GLU contendo íons Cu^{2+}	Adsorção iônica e ligação covalente	Hidrólise de peróxido de hidrogênio	Çetinus, Şahin e Saraydin (2009)
Tripsina	Hidrogel	LC	Hidrólise de proteínas	Manrich et al. (2008)
Protease	Grãos de Hidrogel	LC	Produção de Vinho	Est et al. (2013)
Lipase	Hidrogel			Rodrigues et al. (2008).
	Quitosana-alginato-laurinaldeído	LC	Hidrólise de ésteres	Mendes, Castro, Giordano (2013).
	Quitosana-alginato-TNBS			

Fonte: Do autor

Pela Tabela 6 é possível identificar diversos trabalhos que utilizaram da quitosana como suporte para imobilização de alguma enzima. Porém não foram encontrados trabalhos publicados que utilizem o hidrogel de quitosana-glicerol para este fim.

Diante do exposto, a avaliação do potencial do hidrogel de quitosana-glicerol fosfato como suporte para imobilização da lipase (enzima amplamente utilizada em processos industriais) torna-se interessante sob os pontos de vista econômico e ambiental, uma vez que a quitosana é um polímero biodegradável, de baixo custo e derivado de um subproduto da indústria pesqueira.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção são apresentados de forma detalhada os materiais e métodos utilizados na realização deste trabalho.

2.2.1 Material

A lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P) foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro do laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena, da Universidade de São Paulo. Para a síntese do hidrogel foi utilizada quitosana com alto massa molecular e grau de desacetilação acima de 75% (Sigma-Aldrich/EUA) e o sal dissódico de glicerol fosfato (Sigma-Aldrich/EUA). Para a determinação da atividade hidrolítica foi utilizado o azeite de oliva comercial com acidez de 0,5% (Carbonell). Os demais reagentes: goma arábica em pó pura (Synth/Brasil), acetona (Synth) e glutaraldeído 25%, foram utilizados em grau analítico.

2.2.2 Metodologia experimental

Esta seção apresenta os diferentes métodos utilizados no desenvolvimento e caracterização das amostras estudadas.

2.2.2.1 Preparação do hidrogel de quitosana

O hidrogel foi preparado dissolvendo-se quitosana (0,6 g) em 9 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 0,1M à temperatura ambiente e posterior adição (gota a gota) de 1,0 mL de uma solução aquosa do sal dissódico de glicerol fosfato (0,560g/mL) sob agitação. O hidrogel foi autoclavado a 121°C por 15 minutos, congelado com nitrogênio líquido e liofilizado por 7 dias a -20°C, devido ao elevado teor de umidade do hidrogel. Por último, foi macerado para que adquirisse a forma de pó.

2.2.2.2 Preparação da lipase imobilizadas

A lipase foi imobilizada por adsorção física e por ligação covalente a fim de se verificar qual o melhor método para o sistema enzima/suporte estudado. Ambas as metodologias aplicadas para a imobilização foram baseadas no trabalho de Mendes (2009).

2.2.2.2.1 Imobilização por adsorção física

Inicialmente o hidrogel em pó foi embebido em álcool anidro na proporção 1:1,5 (m/v) e mantidos sob agitação de 50 rpm por 6h a temperatura ambiente. Após essa etapa foi adicionado uma solução tampão fosfato pH 7,0 (5mM) na relação 1:60 (suporte:solução) e lipase na relação 1:4 (g:g) e mantidos sob agitação por 18h em temperatura ambiente. Por último o sistema foi filtrado a vácuo e estocado a 4°C.

2.2.2.2 Imobilização por ligação covalente

Foram adicionados ao hidrogel em pó, uma solução tampão fosfato pH 7,0 (0,2M) e glutaraldeído a 25%, na proporção 1g:1,2mL:1,7mL (suporte:tampão:glutaraldeído). O sistema foi colocado sob agitação de 50 rpm por 1h e por fim o hidrogel foi lavado com água destilada para retirar o glutaraldeído não ligado e estocado em um dessecador por 7 dias. Após essa etapa, o hidrogel ativado com glutaraldeído foi embebido em 60 mL de álcool anidro e mantido sob agitação de 50 rpm por 6h a temperatura ambiente. Foi então adicionada uma solução tampão fosfato pH 7,0 (5mM) na relação 1:60 (suporte:solução) e lipase na relação 1:4 (suporte:enzima) mantendo-se a agitação por 18h em temperatura ambiente. Por último o sistema foi filtrado a vácuo e estocado a 4°C.

2.2.2.3 Caracterização do suporte e do derivado imobilizado

Todas as amostras analisadas foram submetidas à análise morfológica, química e térmica. Além disso, a lipase livre e imobilizada foram caracterizadas quanto a algumas propriedades cinéticas.

2.2.2.3.1 Análise morfológica

A análise da morfologia da superfície do suporte foi realizada através de imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. As amostras foram recobertas com um filme ouro de espessura de 16 nm no Sputter Coater de marca Bal-Tec modelo SCD 050 por 60 segundos à uma pressão de operação de 2×10^{-2} Pa e temperatura de 24°C. Feito isso, as amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura, Topcon SM300 do Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

2.2.2.3.2 Análise química

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi utilizada para identificar e caracterizar as ligações químicas entre o suporte e a lipase, bem como os grupos funcionais presentes nas amostras. O Cary 630 (Agilent Technologies/EUA) foi utilizado e não foi necessária a preparação das amostras. A análise foi realizada no Laboratório de Espectrofotometria e Cromatografia Ambiental na Unifal-MG.

2.2.2.3.3 Análise Térmica

A perda de massa das amostras em função da temperatura foi avaliada através da técnica de Termogravimetria no calorímetro STA 449F3 (Netzch/Alemanha) sob atmosfera de argônio, com temperatura inicial de 30°C até 500°C e taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ e massa de 5,00 ± 0,5g. A análise foi realizada no Laboratório de Espectrofotometria e Cromatografia Ambiental na Unifal-MG.

2.2.2.3.4 Determinação do teor de umidade da enzima livre e imobilizada

O teor de umidade tanto da lipase livre quanto da lipase imobilizada (enzima com suporte) por ADS e LC, foi determinado a partir da Equação 1:

$$Umidade = \frac{(M_{úmida} - M_{seca}) \cdot 100}{M_{úmida}} \quad (1)$$

Em que: $M_{úmida}$ = massa da enzima antes da secagem (g); M_{seca} = massa da enzima obtida após secagem em estufa a 100°C por 24h (g).

2.2.2.3.5 *Rendimento de Imobilização (n)*

O rendimento de imobilização foi calculado a partir da Equação 2:

$$n (\%) = \frac{U_x 100}{U_o} \quad (2)$$

Em que: U_o = unidades de atividade hidrolítica oferecidas para imobilização; U_x = unidades de atividade hidrolítica total presente na enzima imobilizada.

2.2.2.3.6 *Teor de Proteína*

O teor de proteína foi determinado pelo método Folin-Lowry modificado por Layne (1975) e utiliza Folin-Ciocalteu e soroalbumina bovina como padrão. Foi preparada 6mL de uma solução contendo carbonato de sódio 20%, hidróxido de sódio 1M, sulfato de cobre 5% e tartarato de sódio 10%. Nessa solução foi acrescentado 1 mL da amostra e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Por fim adicionou-se 0,5 mL de Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada na proporção 1:2) e esperou-se 30 minutos para realizar a leitura no espectrofotômetro a 600 nm.

Para o cálculo do teor de proteína foi utilizada a equação da reta (Equação 3) com R^2 de 0,9809 originada pela curva padrão feita com diferentes concentrações de soroalbumina bovina (Apêndice 1).

$$Y = 0,9916x + 0,00254 \quad (3)$$

Em que: y = absorvância (nm); x = concentração de proteína (mg).

Os valores de absorvância encontrados para as amostras foram substituídos na Equação 3.

2.2.2.3.7 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica de todas as análises que utilizam a lipase livre em solução, imobilizada por ADS e por LC foi determinada pelo método de hidrólise (Soares et al, 1999). Em erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 5 mL de emulsão de azeite de oliva preparada a uma proporção fixa de óleo/ água (1:1), 4 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 7,0 (0,1M) e 1 mL de lipase em solução (0,5mg/mL) ou 0,1g de lipase imobilizada. Os frascos foram então incubados a 37°C por 5 minutos, em banho termostaticado com agitação. Após esse período a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de uma solução etanol/água (1:1). Por fim, os ácidos graxos liberados (acidez total) foram titulados com solução de KOH 0,025M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados utilizando a Equação 4 e a unidade utilizada foi a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação (U/g).

$$\text{Atividade} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g.min}} \right) = \frac{(V_A - V_B).M.10^6}{t.m} \quad (4)$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco (mL); M = molaridade da solução de KOH (M); t = tempo de reação (min); m = massa seca (g).

Foi utilizado um padrão (branco) adequado para cada atividade analisada (enzima livre, enzima imobilizada por ADS e enzima imobilizada por LC). Para a leitura do branco da amostra enzima livre, utilizou-se apenas solução tampão e emulsão. Para as enzimas imobilizadas por ADS e LC, os brancos utilizados continham, além de solução tampão e emulsão, hidrogel e hidrogel ativado, respectivamente.

2.2.2.3.8 Determinação dos parâmetros cinéticos

A influência da concentração do substrato na atividade hidrolítica foi analisada também pelo método de hidrólise (Soares et al. 1999), variando-se a proporção de

azeite na emulsão de 5-70%. A constante de Michaelis-Menten (k_M) e a concentração de substrato na qual metade da taxa máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) ocorre foram calculadas pela linearização de Lineweaver Burk com o auxílio do programa Excel 2007.

2.2.2.3.9 Estabilidade Térmica

Para a avaliação da estabilidade térmica, um mL da lipase livre em solução (0,5mg/mL) ou 0,1g da lipase imobilizada foi incubado na presença de 1 mL de tampão fosfato pH 7,0 (0,1M) a 60°C durante intervalos de tempo diferentes (15, 30, 60, 90, 120 e 150 min). As amostras foram então resfriadas em banho de gelo e a atividade hidrolítica residual foi calculada utilizando o método citado no item 2.2.2.3.7. A constante de desnaturação (k_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram calculados por meio das Equações 5 e 6, respectivamente, considerando uma desnaturação térmica de 1ª ordem.

$$A = A_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad (5)$$

Em que: A= atividade hidrolítica no tempo (t), A_0 = Atividade hidrolítica no tempo t_0 ; k_d = taxa de desnaturação (min^{-1}); t= tempo de incubação (min).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0,5}{-k_d} \quad (6)$$

Em que: $t_{1/2}$ = tempo de meia vida da enzima (min); k_d = constante de inativação térmica (min^{-1}).

2.2.2.3.10 Estabilidade ao Período de Estocagem

As lipases livre e imobilizada foram armazenadas a 4°C por um período de 120 dias e durante esse tempo verificou-se a cada um mês, se houve diminuição considerável na atividade hidrolítica. Para isso utilizou-se a metodologia descrita no item 2.2.2.3.7.

2.2.2.3.11 Delineamento Experimental

A influência do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase foi investigada utilizando o planejamento fatorial completo 2^2 estrela rotacional para a lipase livre e a lipase imobilizada por LC obtendo como resposta a atividade hidrolítica. Os ensaios ocorreram de forma randômica com três réplicas no ponto central. Os resultados foram analisados no programa Statistica StatSoft versão 7.0. A significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinada pelo valor de p encontrado e o modelo da equação de segunda ordem foi determinado por teste de Fischer e a proporção da variância do modelo obtido foi dada pelo coeficiente de determinação múltipla, R^2 . Os valores de pH e temperatura utilizados para realizar o delineamento, considerando pH de 7,5 e temperatura de 50°C como ponto central segundo Silva et al. (2011) são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de pH e temperatura encontrados para o delineamento

	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	6,1	6,5	7,5	8,5	8,9
Temperatura (°C)	36	40	50	60	64

Fonte: Do autor

Para a lipase imobilizada por ADS foi utilizado um planejamento linear, pois o planejamento fatorial completo 2^2 estrela rotacional não foi adequado esses dados. A única mudança de um planejamento para outro é os pontos considerados, neste caso considera-se somente 3 pontos, como é mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de pH e temperatura encontrados para o delineamento linear.

	-1	0	+1
pH	6,5	7,5	8,0
Temperatura (°C)	40	50	60

Fonte: Do autor

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade da utilização de um hidrogel à base de quitosana e glicerol fosfato para imobilização da lipase produzida pelo fungo *Rhizopus oryzae*. Essa escolha ocorreu pelo baixo custo e biodegradabilidade do hidrogel e pela ampla aplicação da lipase nos processos industriais. A enzima foi imobilizada por adsorção física e por ligação covalente, sendo o glutaraldeído usado como reticulador/ativador. O hidrogel foi caracterizado quanto a morfologia, composição química e comportamento térmico. O sistema suporte-enzima também foi caracterizado. Além disso, a atividade hidrolítica e a estabilidade da enzima livre e imobilizada também foram avaliadas.

2.3.1 Hidrogel de Quitosana

Para aumentar a área superficial e conseqüentemente a área de interação suporte/enzima, utilizou-se o hidrogel de quitosana-glicerol fosfato na forma de pó. A Figura 5 mostra as diferentes morfologias apresentadas pelo material antes de se obter a sua forma final de pó. A Figura 5a mostra o hidrogel recém preparado e na Figura 5b tem-se o hidrogel autoclavado. O material liofilizado é apresentado na Figura 5c e, em forma de pó, na Figura 5d. É possível notar de forma visual que a diferença principal entre as etapas é a quantidade de água presente no material.

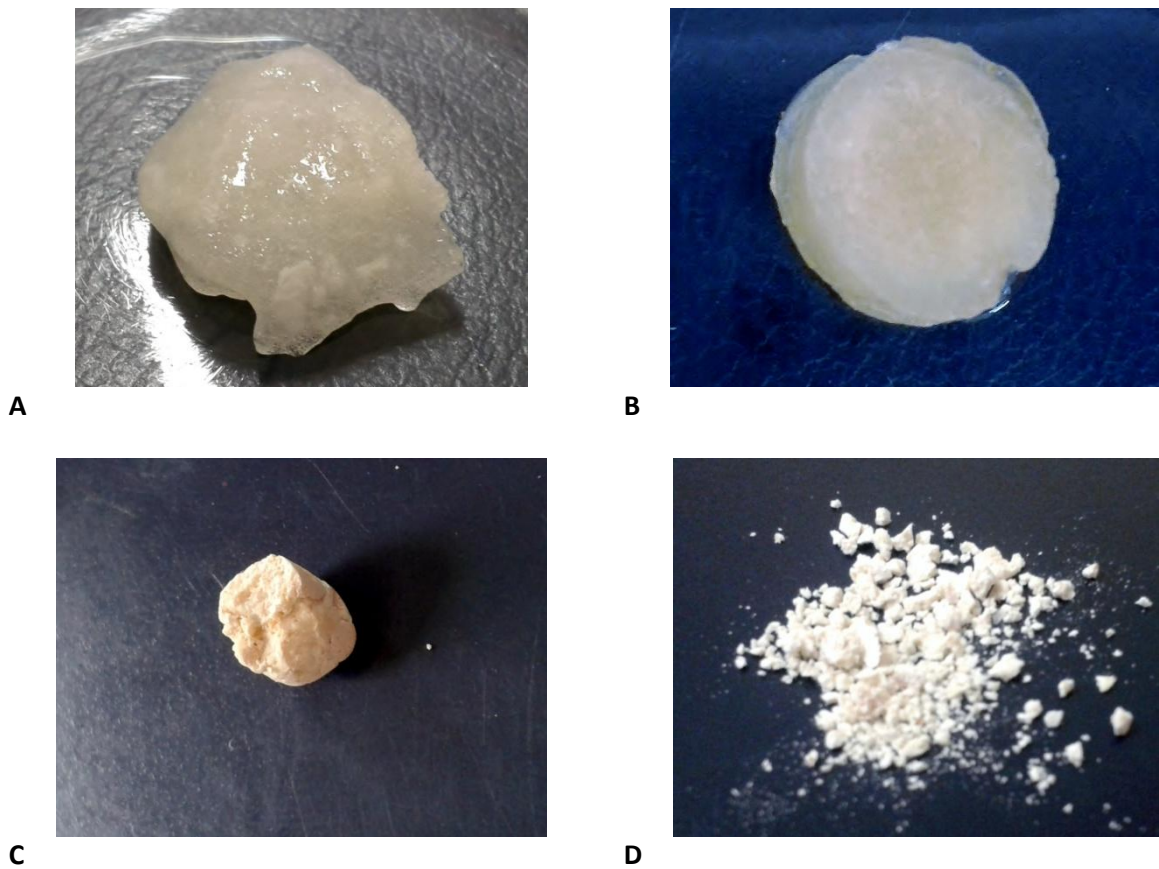


Figura 5 - Hidrogel em suas diferentes etapas:
A) Antes de autoclavar
B) Após autoclavar
C) Após liofilização
D) Hidrogel em pó

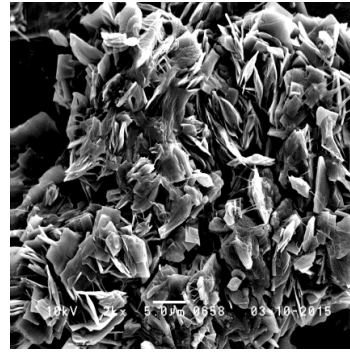
Fonte: Do autor

2.3.2 Caracterização Morfológica

As imagens foram obtidas em voltagem relativamente baixa, pois as amostras apresentaram sensibilidade ao calor gerado. As Figuras 6, 7, 8 e 9 mostram o hidrogel de quitosana-glicerol, o hidrogel reticulado com glutaraldeído 25%, o hidrogel contendo lipase imobilizada por ADS e o hidrogel com lipase imobilizada por LC, respectivamente, em diferentes aumentos.



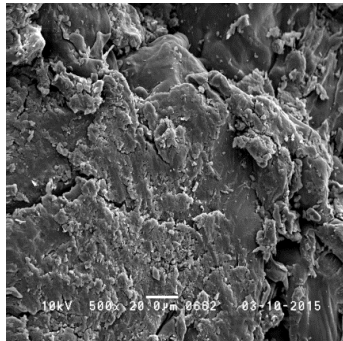
A



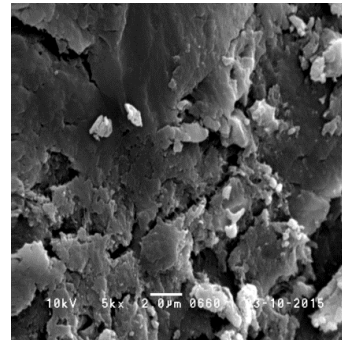
B

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura do hidrogel quitosana-glicerol fosfato (em pó liofilizado):
 A) com aumento de 500x
 B) com aumento de 2000x.

Fonte: Do autor



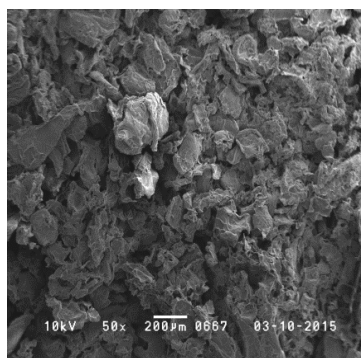
A



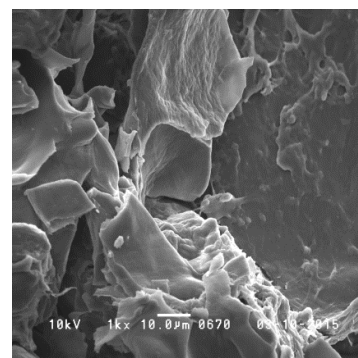
B

Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura do hidrogel reticulado com glutaraldeído 25%:
 A) com aumento de 500x
 B) aumento de 2000x.

Fonte: Do autor



A



B

Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura da lipase imobilizada por ADS:
 A) com aumento de 50x
 B) aumento de 1000x.

Fonte: Do autor

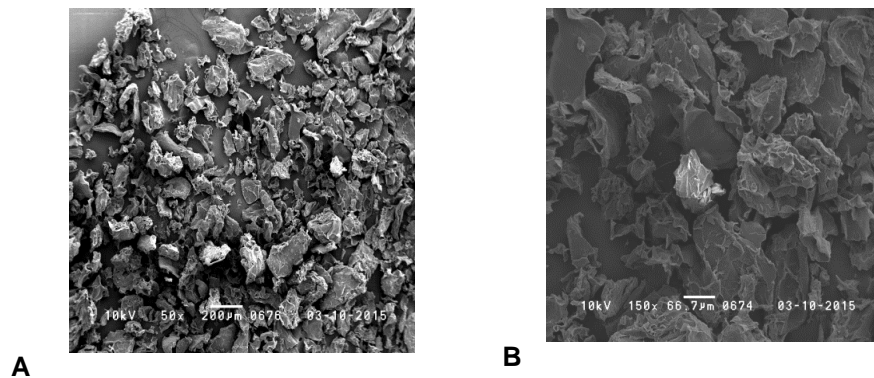


Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura da lipase imobilizada por LC:
 A) com aumento de 50x
 B) aumento de 150x.

Fonte: Do autor

Observando as imagens a 6b e 7b é possível notar que a reticulação com glutaraldeído reduziu a porosidade superficial do hidrogel reticulado, que apresentou uma estrutura mais densa e com poucos poros aparentes. As amostras da Figura 8 e 9 possuem em sua composição a lipase que são macromoléculas e por isso não foi possível obter imagens com o mesmo aumento das outras figuras possuem. Devido a essa diferença não se comparou essas imagens com a Figura 6 e 7.

2.3.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Para averiguar se houve alguma modificação química significativa no hidrogel após a reticulação com glutaraldeído e imobilização da lipase por ADS e LC foram obtidos os espectros de infravermelho do hidrogel, da lipase livre, do suporte contendo lipase imobilizada por adsorção física, do hidrogel reticulado com glutaraldeído e do suporte contendo enzima imobilizada por ligação covalente. A Figura 10 apresenta todos os espectros, enquanto a Figura 11 mostra o espectro do hidrogel e do hidrogel reticulado com glutaraldeído.

A análise dos espectros da Figura 10 mostra que todos os materiais apresentam bandas de $3000-3500\text{ cm}^{-1}$, correspondente a vibração do estiramento do grupo OH de ácido carboxílico (MILASINOVIC et al., 2010). Outras bandas

comuns a todas as amostras ocorreram entre 1900-1200 cm^{-1} e são devido à presença do grupo peptídico no material. A presença desta banda já era esperada visto que todos os materiais são ou possuem em sua composição amino grupo ou ligação peptídica. A banda de 1700-1600 cm^{-1} é referente a amida I e as vibrações de C=O de ácido carboxílico (CHATTERJEE, 2010; MILASINOVIC et al., 2010). A banda na faixa de 1600-1510 cm^{-1} presente no espectro (c), (d) e (e) referente à ligação N-H com contribuição da vibração de C-N e a mudança na faixa de 1500-1400 cm^{-1} (banda característica de grupo amino) são indícios de que houve a imobilização da lipase no suporte (HOU et al., 2014). Já na Figura 11 é possível notar que é nessa faixa que ocorre a reticulação do hidrogel pelo glutaraldeído, visto que essa reação também causa uma mudança nessa mesma banda de 1600-1510 cm^{-1} . Ainda na Figura 11 ficou visível uma mudança na banda de 900-850 cm^{-1} que é referente ao alongamento da ligação C-N, também causado pela reticulação. Por fim, a banda 1100-900 cm^{-1} presente em todos os espectros ocorre devido à ligação C-O característica de polissacarídeos (CHATTERJEE, 2010). De modo geral, com exceção dos hidrogéis sem enzima, os espectros obtidos foram bastante semelhantes, o que indica uma mesma natureza do suporte e da enzima, havendo somente uma diferença na intensidade das bandas.

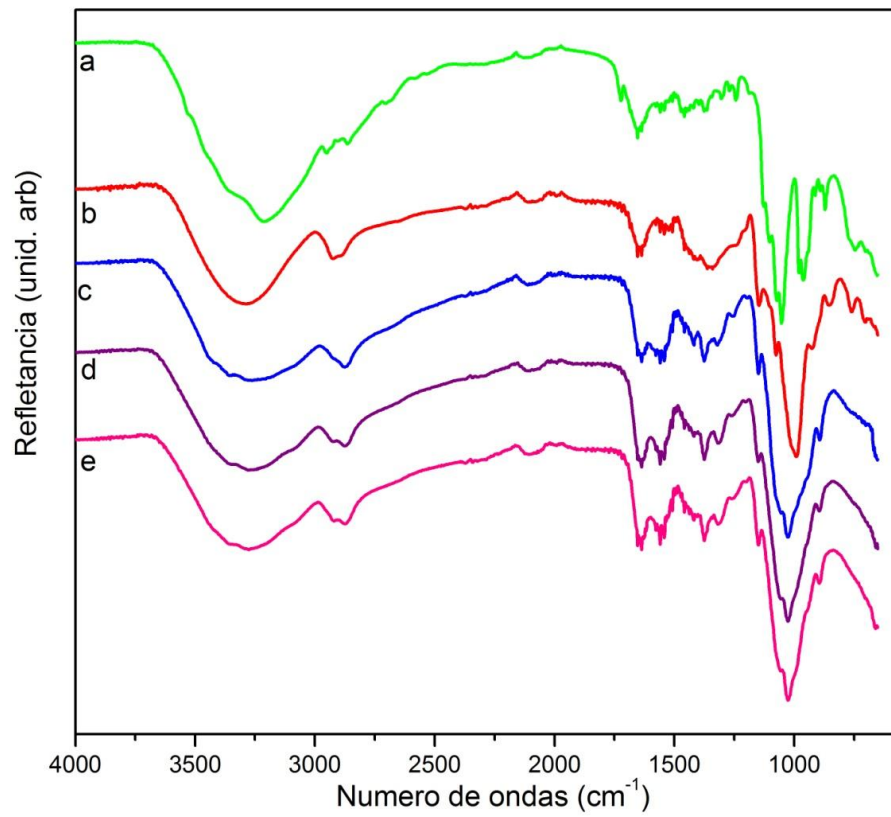


Figura 10 - Espectro de infravermelho: (a) hidrogel; (b) lipase livre; (c) lipase imobilizada por ADS; (d) hidrogel ativado com glutaraldeido; (e) lipase imobilizada por LC.
Fonte: Do autor

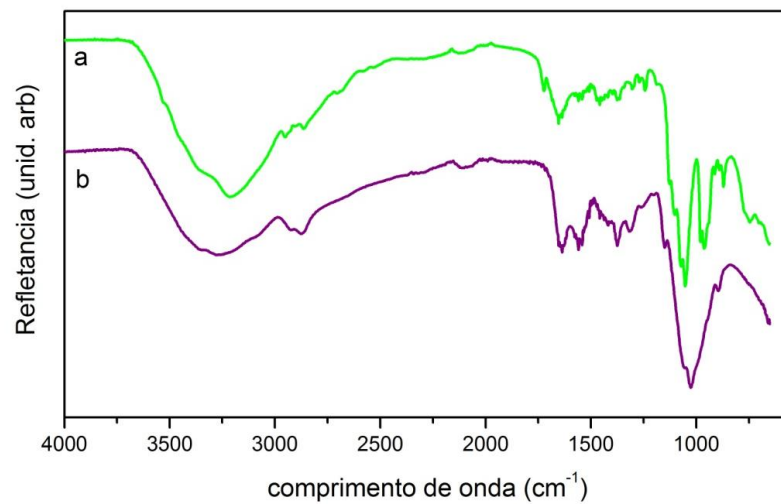
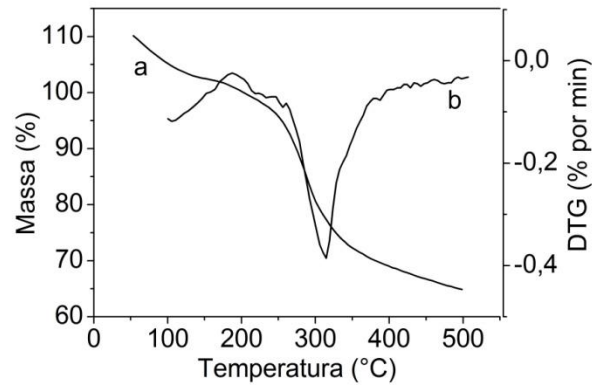


Figura 11 - Espectro de infravermelho: (a) hidrogel; (b) hidrogel reticulado com glutaraldeido.
Fonte: Do autor

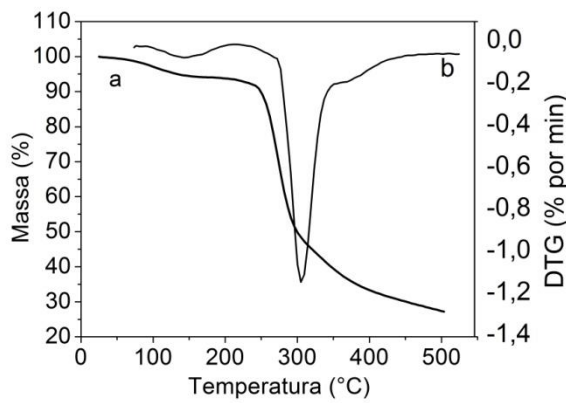
2.3.4 Termogravimetria (TG)

As curvas TG do hidrogel, enzima, hidrogel reticulado com glutaraldeído, e suporte contendo as lipases imobilizadas e suas respectivas derivadas (DTG) foram plotadas com o auxílio do programa Origin 8 e são apresentadas na Figura 12. Todas as curvas apresentam um comportamento semelhante, ocorrendo uma perda de massa entre 100 – 150°C referente a perda de água adsorvida na superfície. Uma segunda perda mais acentuada entre 300 – 350°C ocorreu devido à decomposição de espécies de baixo peso molecular, seguida de uma queda gradativa até em torno de 500°C devido a desidratação dos anéis sacarídeos, despolimerização e decomposição das unidades do polímero orgânico. Um resultado semelhante foi relatado em Silva et al. (2011) em que um polímero híbrido de quitosana-SiO₂ apresentou uma perda em 155°C referente a perda de água e outra em 275°C referente a decomposição do polímero. Fernandes et al. (2014) estudou a imobilização de lipase de *Candida antarctica* Fração B em PHBV e a obteve como resultado da análise térmica uma degradação total do polímero a 297°C.

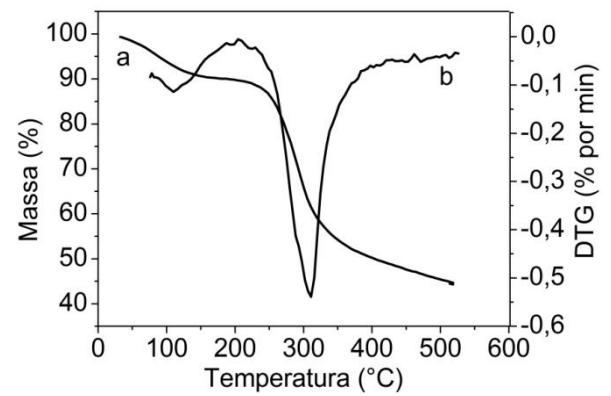
A primeira perda de massa foi de aproximadamente 10% para o hidrogel, lipase livre, hidrogel contendo lipase imobilizada por ADS e hidrogel contendo lipase imobilizada por LC (curvas (a), (b), (c) e (e)), diferindo-se apenas para o hidrogel reticulado (curva (d)), com perda de aproximadamente 5%. Os materiais analisados apresentaram comportamentos diferentes com relação a segunda perda de massa. Enquanto os suportes contendo a lipase imobilizada por ADS e a lipase imobilizada LC perderam por volta de 50% de sua massa total, o hidrogel perdeu 30% e o hidrogel reticulado com glutaraldeído apenas 15% de suas respectivas massas. A maior perda de massa foi observada para a lipase livre com cerca de 60% de sua massa inicial. Ao final da análise a massa residual do hidrogel foi de 65%, dos suportes com a lipase imobilizada foi em torno de 45% (para ambas as imobilizações), de 75% para o hidrogel reticulado e 30% para a lipase livre. O hidrogel reticulado apresentou a menor perda devido à estrutura tridimensional obtida através da ligação covalente entre as cadeias da quitosana, que dificulta a decomposição do hidrogel. Após a imobilização, a perda de massa da lipase diminuiu, comprovando uma melhora na estabilidade térmica mesma.



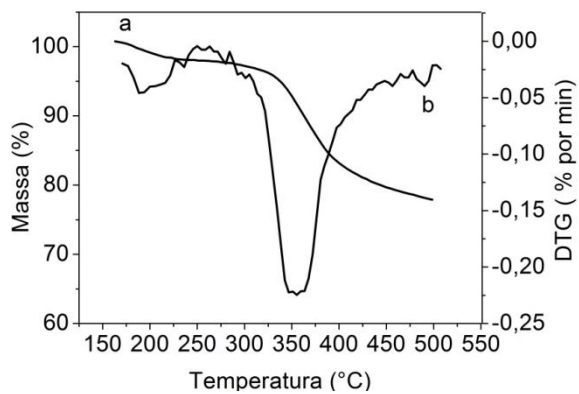
a



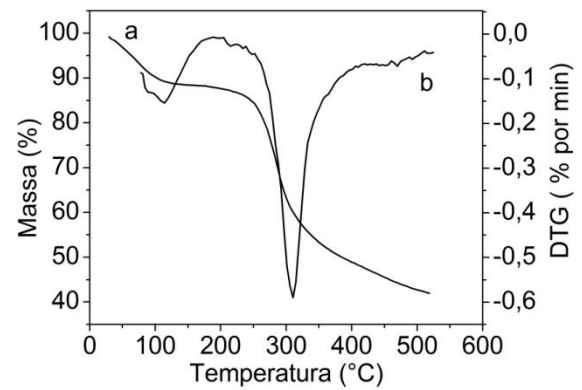
b



c



d



e

Figura 12- Curva (a) TG e (b) DTG de: (a) hidrogel; (b) lipase livre; (c) suporte contendo lipase imobilizada por ADS; (d) hidrogel reticulado com glutaraldeido; (e) suporte contendo lipase imobilizada por LC.

Fonte: Do autor

2.3.5 Imobilização da lipase

A Tabela 9 apresenta os dados relativos à atividade hidrolítica a pH=7,0 e temperatura 37°C, umidade, rendimento de imobilização, teor de proteína e atividade específica.

O valor da atividade hidrolítica de ambas as enzimas imobilizadas apresentaram um valor menor que o da enzima livre, 406,30 U/g para lipase imobilizada por ADS e 439,82 u/g para a lipase imobilizada por LC, que corresponde a uma redução na atividade de 96,5% e 96%, respectivamente. Essa queda na atividade hidrolítica é reportada na literatura (ANDRADE, 2011; GOMES, 2006; PAULA, 2008). Ela ocorre devido as possíveis modificações nas propriedades físico-químicas e na cinética da enzima, como por exemplo, a modificação conformacional da molécula da enzima, estereo-química e efeitos da difusão.

O rendimento de imobilização por ADS foi de 28% provavelmente devido às ligações fracas que se formam entre a lipase e o suporte. Conforme esperado o rendimento da imobilização por LC foi maior (35%) se comparado ao obtido por ADS, devido ao agente reticulante que possibilita a formação de ligações mais fortes entre a enzima e o suporte.

Tabela 9 - Teor de umidade e atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada

Enzima	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica* (U/g)	Rendimento de Imobilização (%)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica
Livre	6	11276,87±703,21	-	0,486	23194,66
ADS	69	406,30±16,57	28	0,233	1743,34
LC	55	439,82±41,79	35	0,297	1521,72

*valor em massa seca

Fonte: Do autor

Abbas e Comeau (2003), Mendes et al. (2011) e Paula et al. (2008) reportaram um resultado similar quanto à redução da atividade hidrolítica após a imobilização. O primeiro autor estudou a lipase de *Mucor* sp. imobilizada em Ambirlite IRC 50 e apresentou atividade específica da lipase livre de 226 U/mg e 106 U/mg para a lipase imobilizada. O segundo autor citado imobilizou TLL em diferentes combinações de quitosana, co-biopolímeros (gelatina, alginato, etc) e agentes

ativadores e o resultado encontrado foi que enquanto a lipase livre apresentou atividade hidrolítica de 1760 U/g, a lipase imobilizada no suporte quitosana-alginato modificado com TNBS e reticulado com glutaraldeído 25% apresentou atividade hidrolítica de 234,6 U/g. Paula et al. (2008) encontrou uma atividade hidrolítica de 1868 U/mg para lipase livre de *Candida rugosa* e para a lipase imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilalcool por ADS o valor de 480 U/mg e 407 U/mg para a lipase imobilizada por LC.

2.3.5 Parâmetros cinéticos

A fim de avaliar o efeito da concentração do substrato sobre a atividade hidrolítica e a existência de algum tipo de inibição do produto formado, a porcentagem do azeite de oliva na emulsão foi variada na faixa de 5% a 70% e os ensaios foram conduzidos em pH 7,0 a temperatura de 37°C. Na Tabela 10 são apresentadas as atividades hidrolíticas em função da concentração do substrato de cada ensaio e nas Figuras 13 e 14, as curvas geradas por esses valores.

Tabela 10 - Atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em diferentes concentrações de azeite de azeite de oliva.

Azeite de Oliva (%)	Ácidos Graxos (mM)	Atividade Hidrolítica (U/g)		
		Lipase Livre	Adsorção Física	Ligação Covalente
5	186	3758,96 ± 52,94	70,97 ± 16,97	84,45 ± 8,39
10	372	5611,96 ± 211,77	86,92 ± 0,25	144,35 ± 4,62
20	744	7464,97 ± 423,54	119,56 ± 9,65	186,84 ± 11,21
30	1116	10800,38 ± 264,72	173,37 ± 13,17	205,65 ± 1,10
40	1488	10906,27 ± 158,83	204,88 ± 11,76	217,55 ± 7,27
50	1860	11276,87 ± 105,89	268,96 ± 4,35	256,38 ± 3,88
60	2232	14506,39 ± 482,37	295,27 ± 2,64	252,57 ± 8,23
70	2604	14718,16 ± 317,66	299,34 ± 8,97	329,42 ± 1,34

Fonte: Do autor

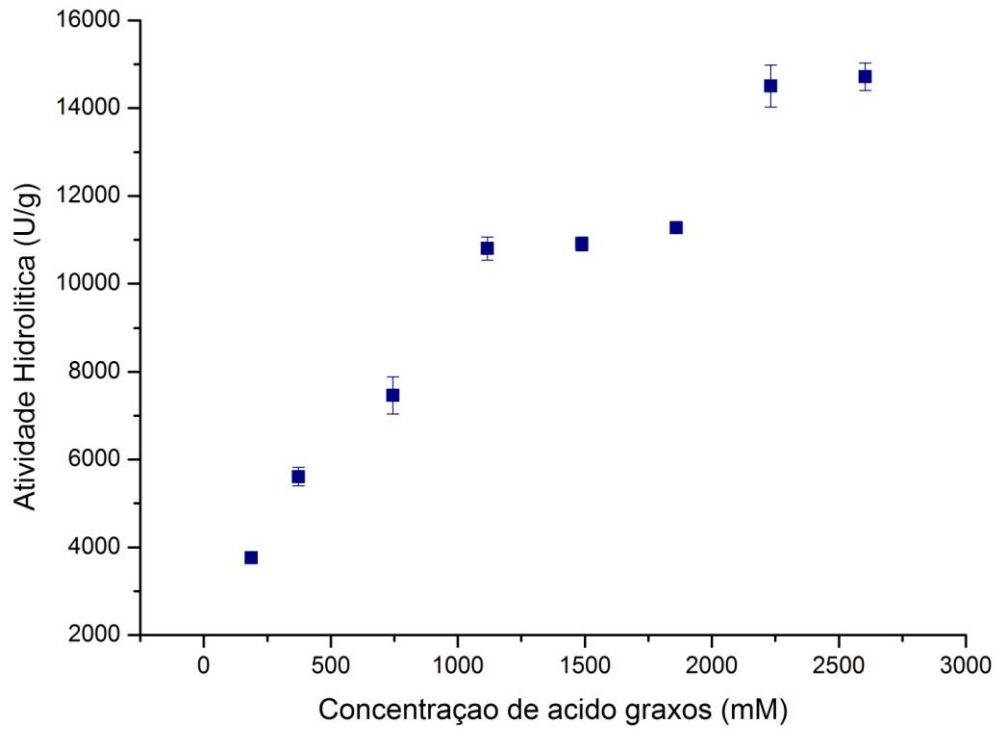


Figura 13 - Atividade da lipase livre em função da concentração de azeite de oliva
Fonte: Do autor

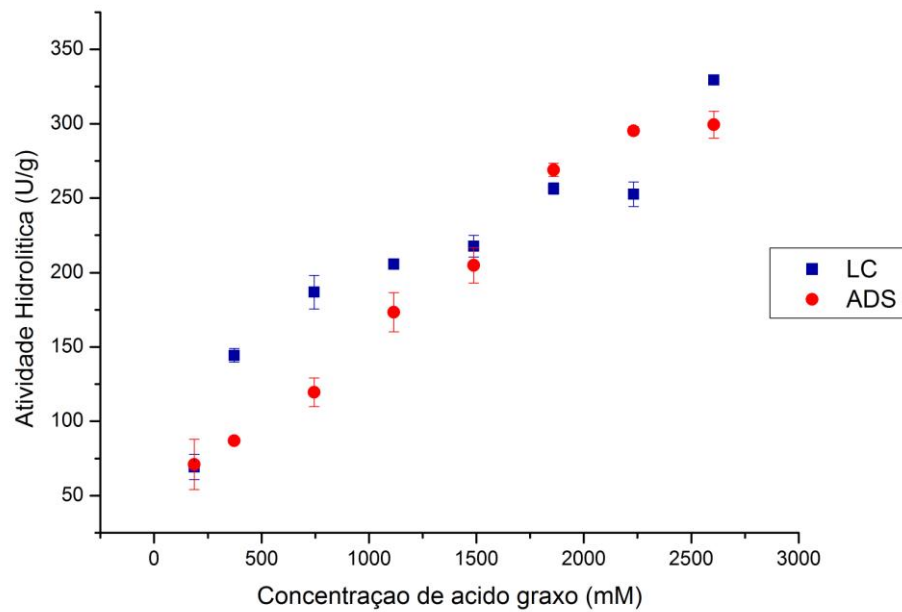


Figura 14 - Atividade da lipase imobilizada por ADS e LC em função da concentração de azeite de oliva.

Fonte: Do autor

A constante de Michaelis-Menten (k_m) e a velocidade máxima de reação $V_{m\acute{a}x}$ foram obtidas pela linearização de Lineweaver Burk das curvas de atividade hidrolítica em função da concentração de substrato (Figura 13 e 14), cujas curvas apresentaram R^2 de 0,976 para a lipase livre, 0,8894 para a lipase imobilizada por ADS e 0,9693 para a imobilização por LC. Os valores encontrados para cada parâmetro são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores de k_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a lipase livre e imobilizada

Lipase	k_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/g)
Livre	653,33	16666,67
Imobilizada por ADS	654,08	294,12
Imobilizada por LC	771,89	370,37

Fonte: Do autor

O valor de k_m aumentou ligeiramente após a imobilização, sendo 654,08 mM para a imobilização por ADS e 771,89 mM para a imobilização por LC. Porém, o aumento não é significativo mostrando que mesmo após a imobilização não há diferença na afinidade do substrato pela enzima.

O valor da $V_{m\acute{a}x}$, por outro lado, diminuiu consideravelmente em ambas as imobilizações, chegando a 294,12 U/g para a imobilização por ADS e 370,37 U/g para a imobilização por LC. Essa queda indica uma perda na habilidade catalítica da lipase ocasionada pelas mudanças físico-químicas após a imobilização. A queda no valor de $V_{m\acute{a}x}$ sem alteração no valor de k_M indica uma possível inibição não competitiva, ou seja, o inibidor liga-se à lipase em um ponto diferente do sítio ativo que altera a velocidade com que a enzima forma o complexo enzima-substrato.

Em seu estudo Li et al. (2011) imobilizou lipase de *Pseudomonas cepacia* em membranas nanofibrosa de poliacrilonitrila e encontrou um valor de k_m de 56,7 nM para a lipase livre e 88,4 nM para a lipase imobilizada. Paula et al. (2008) encontrou um valor de k_m de 170 μ M para lipase livre e 409 μ M e 210 μ M para lipase imobilizada por ADS e por LC, respectivamente. Silva et al. (2011) imobilizou lipase de *Burkholderia cepacia* em um polímero híbrido de quitosana-SiO₂ e o valor de k_m encontrado foi de 334mM e 819mM para a lipase livre e imobilizada, respectivamente.

2.3.6 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica foi avaliada por meio da determinação das atividades hidrolíticas residuais após a incubação da lipase numa temperatura de 60°C em meio aquoso (tampão fosfato de sódio 0,1 M) em pH 7,0 por diferentes tempos. Os valores encontrados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Atividade hidrolítica residual da lipase livre e imobilizada após a incubação numa temperatura de 60°C em diferentes valores de tempo.

Tempo (min)	Atividade Hidrolítica (U/g)		
	Lipase Livre	Adsorção Física	Ligação Covalente
0	1535,35 ± 51,81	492,85 ± 2,32	493,66 ± 2,92
15	1200,00 ± 43,07	485,89 ± 2,36	470,42 ± 12,51
30	750,00 ± 15,88	467,87 ± 3,51	446,44 ± 1,62
60	650,00 ± 13,42	353,99 ± 13,14	382,14 ± 7,28
90	600,00 ± 10,58	322,21 ± 10,21	350,29 ± 0,07
120	450,00 ± 5,02	269,68 ± 7,40	247,31 ± 5,02
150	264,71 ± 2,19	210,73 ± 3,70	212,87 ± 0,85

Fonte: Do autor

As Figuras 15 e 16 mostram o perfil de atividade hidrolítica relativa obtida ao longo do tempo de incubação. O R^2 da curva da lipase livre foi de 0,9678, enquanto da lipase imobilizada por ADS de 0,9789 e 0,9636 para a imobilização por LC.

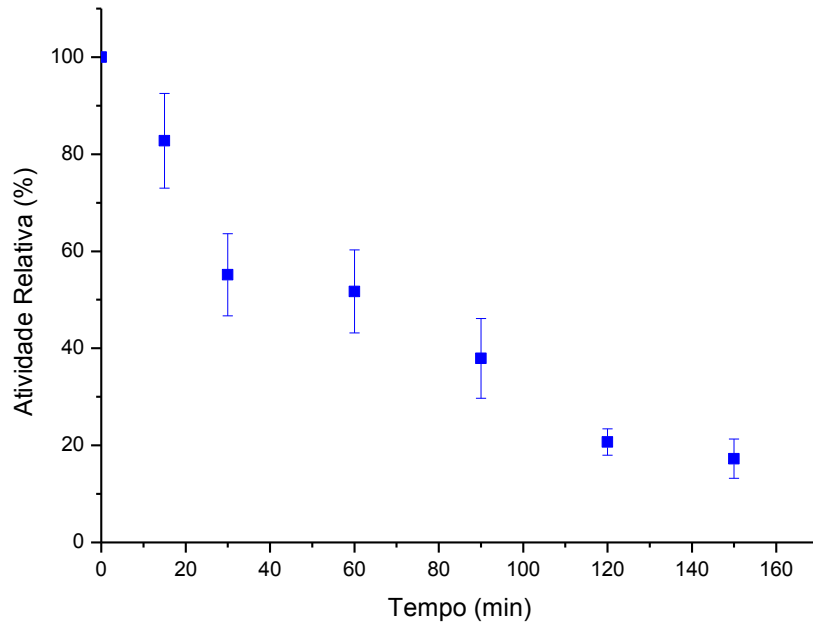


Figura 15 - Atividade hidrolítica residual da lipase livre após diferentes tempos de incubação sob temperatura de 60°C

Fonte: Do autor

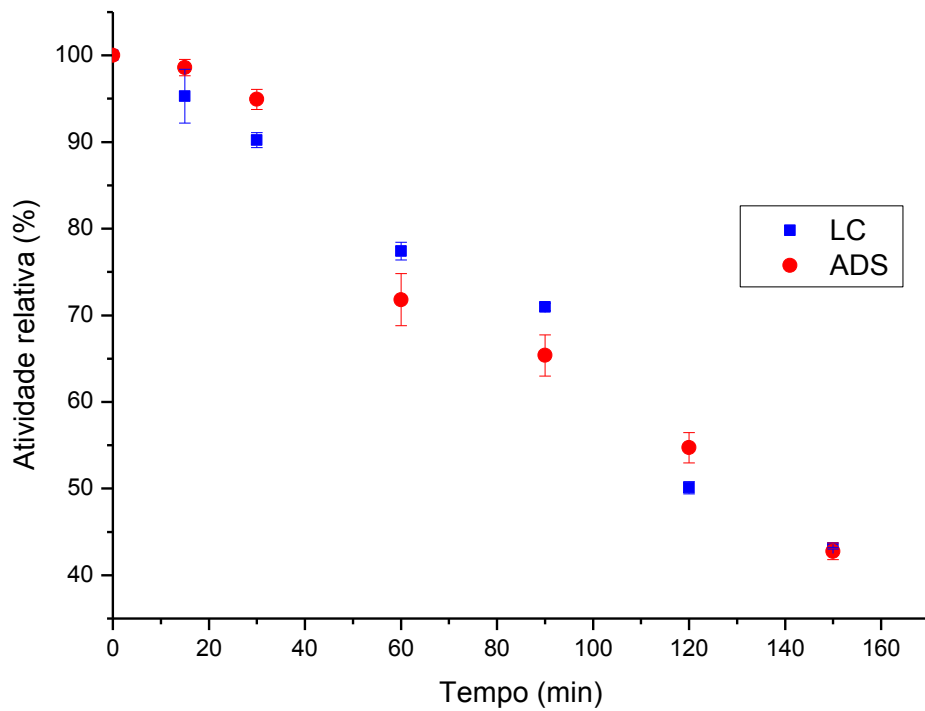


Figura 16 - Atividade hidrolítica residual da lipase imobilizada por ADS e LC após diferentes tempos de incubação sob temperatura de 60°C

Fonte: Do autor

A constante de inativação térmica (k_d) e o tempo de meia-vida foram obtidos pela Equação 5 e 6, respectivamente e os valores calculados são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Constante de inativação térmica (k_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a lipase livre e imobilizada por ADS e LC.

Lipase	k_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
Livre	0,696	0,99
Imobilizada por ADS	0,348	1,99
Imobilizada por LC	0,342	2,03

Fonte: Do autor

Enquanto a lipase livre preserva somente 20% da sua atividade original após um período de incubação de 150 minutos, a enzima imobilizada por ADS permanece com 40% e a imobilizada por LC com 45%. Esse comportamento confirma o resultado obtido pelas curvas TG que indicou uma melhora na estabilidade térmica da lipase após sua imobilização.

Fernandes et al. (2014) e Silva et al. (2012) apresentaram em seus estudos resultados semelhantes. Fernandes et al. (2014) imobilizou lipase de *Candida antarctica* em PHBV e a atividade residual após 1h a 60°C para a lipase livre foi de 2,43% da atividade original enquanto a lipase imobilizada foi de 82%. Silva et al. (2012) também imobilizou *Candida Antarctica*, porém em hidrogel à base de quitosana e encontrou uma atividade residual de 10% para lipase livre e 35% para a lipase imobilizada após 4h em 60°C.

2.3.7 Estabilidade ao período de estocagem

A estabilidade ao período de estocagem foi determinada avaliando a atividade hidrolítica de cada uma das amostras estudadas (lipase livre, imobilizada por ADS e imobilizada por LC) a cada trinta dias durante cento e vinte dias. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de atividade hidrolítica obtidos mensalmente

	Atividade Hidrolítica (U/g)			
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Livre	12567,92 ± 267,76	10487,21 ± 245,23	11923,56 ± 176,89	10611,12 ± 56,11
ADS	410,45 ± 43,67	405,23 ± 56,13	407,49 ± 39,98	408,56 ± 38,56
LC	441,32 ± 33,91	437,54 ± 29,76	439,74 ± 31,44	436,87 ± 24,71

Fonte: Do autor

Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois tanto a lipase livre quanto a imobilizada por ADS ou LC apresentaram estabilidade à estocagem. Após 120 dias de estocagem não houve perda significativa na atividade hidrolítica de nenhuma amostra.

2.3.8 Delineamento experimental

A Tabela 15 mostra os valores da atividade hidrolítica obtida utilizando os valores do delineamento experimental para estudar o efeito combinado do pH (X_1) e da temperatura (X_2) utilizando um planejamento fatorial completo 2^2 estrela rotacional com três replicas no ponto central.

Tabela 15 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo o planejamento composto central 2^2 estrela rotacional para estudo da influência do pH e temperatura na atividade hidrolítica.

Variáveis		Atividade Hidrolítica (U/g)		
pH	Temperatura (°C)	Lipase Livre	ADS	LC
7,5	36	12176,90±1270,63	482,20±9,71	248,83±20,19
6,5	40	15565,25±2011,84	149,32±4,84	329,78±33,89
8,5	40	12388,67±741,20	542,40±4,28	328,89±24,74
6,1	50	11012,15±635,32	370,19±7,23	253,38±45,13
7,5	50	15988,80±423,54	486,11±7,68	423,28±10,08
7,5	50	17682,97±1482,41	529,13±6,84	547,04±16,65
7,5	50	16253,51±1005,92	383,61±2,88	441,57±24,98
7,5	50	15724,08±52,94	434,69±7,73	482,41±7,70
8,9	50	12759,27±1279,63	263,92±7,56	186,71±13,40
6,5	60	7359,08±105,89	100,02±2,83	76,13±21,44
8,5	60	8788,54±317,66	575,45±10,79	70,33±8,97
7,5	64	5664,91±158,83	262,85±11,07	146,03±40,78

Fonte: Do autor

O efeito individual e a interação entre a temperatura e o pH na atividade hidrolítica para os três casos estudados foram estimados com a ajuda do programa Statistica 7.0. Todos os casos foram estudados considerando um nível de confiança de 95%, ou seja, para que a variável tenha significância $p \leq 0,05$. Nos três casos estudados (lipase livre, imobilizada por adsorção física e por ligação covalente) foi considerado um valor para $F_{[1; n-2; \alpha]} = 4,96$ para a análise de variância.

Para a lipase livre a atividade variou de 5664,91 até 17682,97U/g, para a lipase imobilizada por ADS, de 100,02 até 542,40 U/g e para a imobilização por LC de 70,13 até 547,04 U/g. O maior valor para a lipase livre e imobilizada por LC foi em pH 7,5 e temperatura 50°C, enquanto para a lipase imobilizada foi em pH 8,5 e temperatura 40°C para ADS.

Pelos dados é possível observar que o pH em que houve maior atividade para lipase livre e a imobilizada por LC é o mesmo (pH 7,5), enquanto que o pH da imobilizada por ADS sofreu uma alteração para pH 8,5. A temperatura em que houve maior atividade também apresentou o mesmo comportamento, sendo a mesma para a lipase livre e imobilizada por LC (50°C) e menor para a imobilizada por ADS (40°C). Essas mudanças são similares às mudanças relatadas em outros trabalhos, como por exemplo, em Chiou e Wu (2004) que encontrou uma mudança no pH de 8,0 para 9,0 após imobilização em quitosana e Paula (2007) que relatou mudança no pH de 7,5 para 8,0 e temperatura de 37°C para 40°C (adsorção física) e 55°C (ligação covante) após imobilização em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool.

Essa variação não apresenta uma justificativa única, podendo ser influenciada por diversos fatores desde a fonte da lipase e do suporte até como ocorre à interação enzima/suporte, sendo necessária a realização de estudos que ajudem a determinar qual o fator crucial que leva a essa mudança.

2.3.8.1 Enzima Livre

A Tabela 16 mostra o efeito, o erro padrão, o valor de p para a atividade hidrolítica da enzima livre.

Tabela 16 - Estimativo dos efeitos das variáveis, erro padrão e o valor de p para a atividade hidrolítica da lipase livre usando planejamento central 2² estrela rotacional.

Variável	Efeito	Erro Padrão	p
Média	16404,90	± 437,0696	0,000042*
X ₁ (Linear)	176,48	± 621,2870	0,794849
X ₁ (Quadrático)	-4231,61	± 700,9137	0,009112*
X ₂ (Linear)	-5283,61	± 621,2870	0,003415*
X ₂ (Quadrático)	-7256,93	± 700,9137	0,001922*
X ₁ X ₂	2303,02	± 874,2283	0,078033

*significativo ao nível de 95% de confiança

X₁ e X₂ representam as variáveis: pH e Temperatura, respectivamente

Fonte: Do autor

A análise estatística dos resultados revelou o efeito significativo de ambas as variáveis quadráticas e a variável linear da temperatura, pois o valor de p é menor que 0,05 (nível de 95% de confiança). Em contra partida, a variável linear do pH e a interação entre elas não foram estatisticamente significativas no mesmo nível de confiança.

O modelo estatístico com os respectivos coeficientes foram obtidos através dos dados da Tabela 16, como é apresentado na Equação 7.

$$Y = 16404,90 - 2115,81X_1^2 - 2641,80X_2 - 3628,46X_2^2 \quad (7)$$

Em que: Y= Atividade hidrolítica; X₁²= variável quadrática do pH; X₂= variável linear da temperatura; X₂²= variável quadrática da temperatura.

A Tabela 17 mostra a análise da variância do modelo que descreve a atividade hidrolítica da enzima livre, através do teste F. O coeficiente de determinação (R²) encontrado foi de 0,9606, ou seja, o modelo estudado explica 96,06% da variabilidade experimental.

Tabela 17 - Análise da Variância (ANOVA) para regressão do modelo que representa a atividade hidrolítica em função da temperatura e pH da lipase livre usando planejamento central 2^2 estrela rotacional.

Variável	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado s médios	F	p
X_1 (Linear)	61665	1	61665	0,0807	0,794849
X_1 (Quadrático)	27856882	1	27856882	36,4488	0,009112*
X_2 (Linear)	55274702	1	55274702	72,3230	0,003415*
X_2 (Quadrático)	81926883	1	81926883	107,1955	0,001922*
$X_1 X_2$	5303911	1	5303911	6,9398	0,078033
Falta de Ajuste	4089721	3	1363240	1,7837	0,323167
Erro Puro	2292826	3	764275		

*significativo ao nível de 95% de confiança

X_1 e X_2 representam as variáveis: pH e Temperatura, respectivamente

Fonte: Do autor

Os valores de F apresentados na Tabela 17 das variáveis (X_1 e X_2) quadráticas e a variável linear de temperatura foram maiores que o tabelado (4,96), ou seja, seus valores são significativos. Já o valor de F da variável de falta de ajuste foi menor que o valor tabelado, por isso ele não é significativo, isto é, o modelo estatístico obtido é adequado para descrever a atividade hidrolítica em função do pH e temperatura. Os intervalos de pH (entre 5,5 e 9,0) e temperatura (30°C a 60°C) foram determinados através da superfície de resposta (Figura 17) gerada pelo modelo.

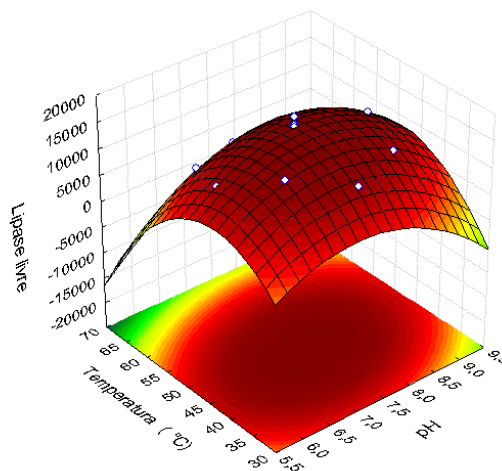


Figura 17 - Superfície de resposta descrita pela Equação 2 que representa a atividade hidrolítica da lipase livre em função do pH e temperatura.

Fonte: Do autor

2.3.8.2 Adsorção Física

A mesma análise estatística foi realizada para a lipase imobilizada por ADS, porém o planejamento fatorial completo 2^2 estrela rotacional apresentou falta de ajuste (Apêndice 2), não sendo o modelo estatístico adequado para descrever a atividade hidrolítica. Sendo assim, para esse caso foi utilizado um modelo 2^2 linear. Os valores de pH e temperatura utilizados para realizar o delineamento tiveram que ser recalculados e com o mesmo ponto central (pH 7,5 e 50°C) determinou-se os novos valores.

O efeito individual e a interação entre a temperatura e o pH na atividade hidrolítica e a análise de variância são mostrados nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

Tabela 18 - Estimativo dos efeitos das variáveis, erro padrão e o valor de p para a atividade hidrolítica da lipase imobilizada por ADS usando planejamento linear.

Variável	Efeito	Erro Padrão	p
Média	387,80	± 27,90	0,005138*
X ₁ (Linear)	434,22	± 73,83	0,027709*
X ₂ (Linear)	-8,12	± 73,83	0,922416
X ₁ X ₂	41,17	± 73,83	0,633137

*significativo ao nível de 95% de confiança

X₁ e X₂ representam as variáveis: pH e Temperatura, respectivamente

Fonte: Do autor

A análise estatística dos resultados revelou o efeito significativo somente da variável linear do pH, pois o valor de p é menor que 0,05 (nível de 95% de confiança). Em contrapartida, a variável linear da temperatura (X₂) e a interação entre elas não foram estatisticamente significativas no mesmo nível de confiança. A Equação 8 foi construída utilizando modelo estatístico composto pelos dados da Tabela 18.

$$Y = 387,80 + 217,13X_1 \quad (8)$$

Em que: Y= Atividade hidrolítica; X₁= variável linear do pH.

O coeficiente de determinação (R^2) encontrado para esse modelo foi de 0,8612, ou seja, o modelo estudado explica 86,12% da variabilidade experimental.

Tabela 19 - Análise da Variância (ANOVA) para regressão do modelo que representa a atividade hidrolítica em função da temperatura e pH da lipase imobilizada por ADS usando planejamento linear.

Variável	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados médios	F	p
X_1 (Linear)	188577,4	1	188577,4	34,59697	0,027709*
X_2 (Linear)	66,0	1	66,0	0,01211	0,922416
$X_1 X_2$	1695,4	1	1695,4	00,31104	0,633137
Falta de Ajuste	19753,9	1	19753,9	3,62411	0,197262
Erro Puro	10901,4	2	5450,7		

*significativo ao nível de 95% de confiança

X_1 e X_2 representam as variáveis: pH e Temperatura, respectivamente

Fonte: Do autor

O modelo não apresentou falta de ajuste, pois seu valor é maior que o F tabelado e o p menor que 0,05, como é mostrado na Tabela 19, portanto considerou-se o modelo estatístico obtido adequado para descrever a atividade hidrolítica em função do pH e temperatura. À partir da superfície de resposta gerada (Figura 18) determinou-se a faixa de pH entre 8,0 e 8,6

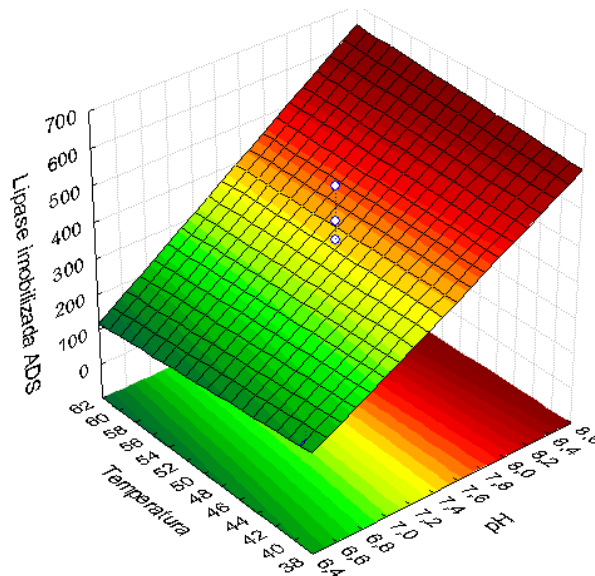


Figura 18 - Superfície de resposta descrita pela Equação 6 que representa a atividade hidrolítica da lipase imobilizada por ADS em função do pH e temperatura.

Fonte: Do autor

2.3.8.3 Ligação Covalente

Os dados da Tabela 20 mostram que as variáveis que apresentam efeito significativo na imobilização por LC são a variável linear e quadrática da temperatura e a variável linear do pH ($p \leq 0,05$) com nível de 95% de confiança. Já a interação entre as variáveis e variável quadrática do pH não foram estatisticamente significativas no mesmo nível de confiança.

Tabela 20 - Estimativo dos efeitos das variáveis, erro padrão e o valor de p para a atividade hidrolítica da lipase imobilizada por LC usando planejamento central 2^2 estrela rotacional.

Variável	Efeito	Erro Padrão	p
Média	461,42	± 17,48	0,000119*
X ₁ (Linear)	-25,26	± 24,85	0,384305
X ₁ (Quadrático)	-247,53	± 28,04	0,003064*
X ₂ (Linear)	-165,69	± 24,85	0,006883*
X ₂ (Quadrático)	-270,61	± 28,04	0,002362*
X ₁ X ₂	-2,453	± 34,97	0,948509

*significativo ao nível de 95% de confiança

X₁ e X₂ representam as variáveis: pH e Temperatura, respectivamente

Fonte: Do autor

A Equação 9 representa o modelo estatístico dos dados da Tabela 19 com seus respectivos coeficientes.

$$Y = 461,48 - 123,77X_1^2 - 82,84X_2 - 135,31X_2^2 \quad (9)$$

Em que: Y= Atividade hidrolítica; X₁²= variável quadrática do pH; X₂= variável linear da temperatura; X₂²= variável quadrática da temperatura.

O coeficiente de determinação (R^2) encontrado para esse modelo foi de 0,9162 e a análise de variância para a lipase imobilizada por ligação covalente é apresentada na Tabela 21.

Tabela 21 - Análise da Variância (ANOVA) para regressão do modelo que representa a atividade hidrolítica em função da temperatura e pH da lipase imobilizada por ligação covalente usando planejamento central 2^2 estrela rotacional.

Variável	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados médios	F	p
X_1 (Linear)	1263,5	1	1263,5	1,03293	0,384305
X_1 (Quadrático)	95321,0	1	95321,0	77,92364	0,003064*
X_2 (Linear)	54356,6	1	54356,6	44,43582	0,006883*
X_2 (Quadrático)	113925,0	1	113925,0	93,13218	0,002362*
$X_1 X_2$	6,0	1	6,0	0,00492	0,948509*
Falta de Ajuste	17498,3	3	5832,8	4,76820	0,115958*
Erro Puro	3669,8	3	1223,3		

*significativo ao nível de 95% de confiança

X_1 e X_2 representam as variáveis: pH e Temperatura, respectivamente

Fonte: Do autor

A superfície de resposta mostrada na Figura 19 foi gerada através do modelo estatístico que não apresentou falta de ajuste e rege a relação entre o pH, temperatura e atividade hidrolítica. As faixas de pH entre 6,5 e 8,5 e de temperatura entre 35°C e 55°C foram obtidas.

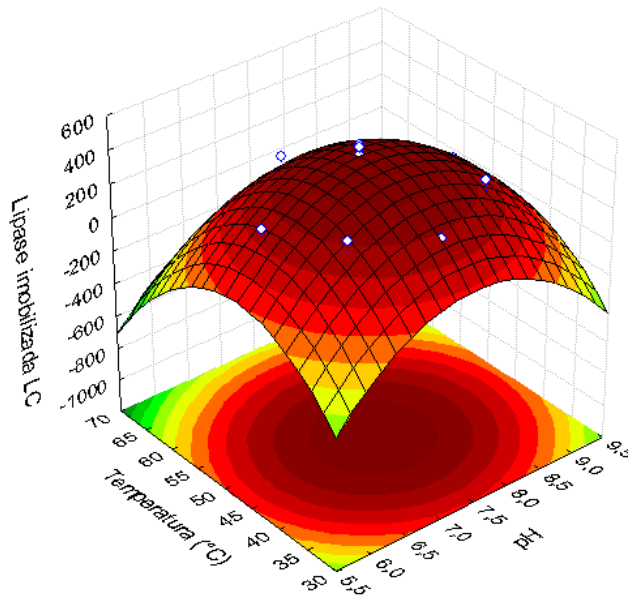


Figura 19 - Superfície de resposta descrita pela Equação 4 que representa a atividade hidrolítica da lipase imobilizada por ligação covalente em função do pH e temperatura.

Fonte: Do autor

Pela análise do delineamento dos três casos, é possível determinar que para a lipase livre a faixa ótima é muito ampla e não fornece um resultado muito preciso quanto aos melhores valores de pH e temperatura em que a enzima irá apresentar um melhor desempenho. Já a lipase imobilizada por ADS mostrou que não há interferência da temperatura na atividade hidrolítica, sendo dependente somente do pH e a lipase imobilizada por LC apresentou uma faixa ótima mais limitada.

2.3.8.4 Validação

A fim de comprovar o resultado encontrado no delineamento, foi repetido o experimento na melhor condição encontrada para cada uma das lipases. Os resultados encontrados são mostrados na Tabela 22.

Tabela 22 - Atividade hidrolítica da enzima livre, imobilizada por ADS e LC nas melhores condições encontradas pelo delineamento

Enzima	pH	Temperatura (°C)	Atividade Hidrolítica (U/g)
Livre	7,5	50	15789,23 ± 445,21
ADS	8,5	60	550,45 ± 12,56
LC	7,5	50	534,98 ± 9,76

Fonte: Do autor

Os valores são semelhantes aos encontrados no delineamento confirmando assim os dados encontrados no planejamento experimental.

3 CONCLUSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de hidrogel a base de quitosana e glicerol fosfato para a imobilização por ADS e LC da lipase de *Rhizopus oryzae*. Os resultados obtidos foram satisfatórios e pelo conjunto de dados pôde-se concluir:

- a) O hidrogel de quitosana-glicerol fosfato é um material com potencial para imobilização da lipase, pois apesar da perda na atividade hidrolítica houve um ganho na estabilidade térmica e operacional da enzima imobilizada por ambas as técnicas (adsorção física e ligação covalente).
- b) A curva de perda de massa foi semelhante para o suporte in natura, reticulado com glutaraldeído e para os derivados imobilizados. A enzima livre apresentou massa residual de 30% enquanto o derivado imobilizado apresentou 45% de massa residual, indicando incremento da estabilidade térmica da enzima.
- c) As imobilizações apresentaram valores semelhantes de rendimento de imobilização, teor de proteína, atividade específica e estabilidade térmica. As enzimas imobilizadas apresentaram k_m semelhante a enzima livre e $V_{m\acute{a}x}$ diferentes o que indica uma possível inibição não competitiva.
- d) A estabilidade no período de estocagem da lipase livre e dos derivados imobilizados foram satisfatórios, visto que não apresentaram perda da atividade hidrolítica após 120 dias.
- e) A combinação entre temperatura e pH que apresentou maior atividade hidrolítica foi determinada pelo delineamento experimental e os valores encontrados foram pH 7,5 e 50°C para a lipase livre e imobilizada por ligação covalente e 8,5 e 60°C para a lipase imobilizada por adsorção física. Foi gerado também uma equação e uma superfície de resposta que descreve a relação das variáveis estudadas (pH e temperatura) com a atividade hidrolítica.
- f) Como eficiência de imobilização e atividade hidrolítica da lipase imobilizada por ADS foram similares àquelas encontradas para a imobilização por LC, sugere-se que a imobilização por adsorção física para este conjunto suporte/enzima é mais adequada, visto que é um método mais barato e que

não utiliza agentes ativadores que podem causar alterações conformacionais desnecessárias no sítio ativo da enzima.

4 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com o intuito de complementar os estudos da viabilidade da utilização do hidrogel de quitosana – glicerol fosfato como suporte para imobilização de lipase, sugere-se:

- a) Aplicar os biocatalisadores em reações de interesse comercial tais como a esterificação;
- b) Avaliar o desempenho dos derivados imobilizados em reações de bateladas consecutivas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme And Microbial Technology**, Marseille, v. 32, n. 5, p.589-595, Abr. 2003.
- ALSARRA, I. A; NEAU, S. H; HOWARD, M. A. Effects of preparative parameters on the properties of chitosan hydrogel beads containing *Candida rugosa* lipase. **Biomaterial**, Riyadh, v. 25, n. 13, p.2645-2655, Jun. 2004.
- AMORIM, R. V. S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, Recife, v. 89, n. 1, p.35-39, Ago. 2003.
- ANDRADE, G. S. S. et al. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolsis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Lorena, v. 84, n. 12, p. 183-188, Dez. 2012.
- ANTCZAK, M. S. et al. Review: Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, Lodz, v. 34, p.1185-1194, 2009.
- AZEVEDO, V.V.C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica De Materiais E Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p.27-34, 2007.
- CARDENAS, F. et al. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzymes And Microbial Technology**, Madrid, v. 28, n. 2, p.145-154, Fev. 2001.
- CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine Chemical by Biotransformation using lipases. **Química Nova**, Lorena, v 18, n. 6, p. 544-554, Abr. 1995.
- CASTRO, H. F. de et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, Lorena, v. 27, n. 1, p.146-156, Jan. 2004.
- ÇETINUS, Ş. A.; ŞAHIN, E.; SARAYDIN, D. Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization. **Food Chemistry**, Sivas, v. 114, n. 3, p.962-969, Jun. 2009.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 1996.
- CHATTERJEE, S. et al. Interaction of malathion, an organophosphorus pesticide with *Rhizopus oryzae* biomass. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 174, n. 1, p. 47-53, Fev. 2010.
- CHENITE, A. et al. Rheological Characterization Of Thermogelling Chitosan/Glycerol-Phosphate Solutions, **Carbohydrate Polymers**, Montreal, v. 46, n. 1 p. 39- 47, Set. 2001.

- CHIOU, S.; WU, W. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, Hsinchu, v. 25, n. 2, p.197-204, Jan. 2004.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, Itajaí, v. 27, n. 4, p.623-630, Jun. 2004.
- DANDEVATE, V.; KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Ester synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on magnetic nanoparticles. **Biocatalysis And Biotransformation**, Gujarat, v. 29, n. 1, p.37-35, Jan. 2011.
- DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal Of Biotechnology And Biodiversity**, Gurupi, v.4, n. 3, p. 184-191. Ago. 2013.
- ELLIAH, P. et al. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, Visakhapatnam, v. 39, n. 5, p.525-528, Jan. 2001.
- FERNANDES, I. A. et al. Nanopartículas de poli-hidroxibutirato-ovalerato como suporte para a imobilização da lipase de *Candida Antarctica* fração B. **Química Nova**, Erechim, v. 37, n. 2, p.331-336, Abr. 2014.
- GHAMGUI, H. et al. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, Sfax, v. 37, n. 1, p.34-41, Out. 2007.
- GOMES, F. M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, Lorena, v. 29, n. 4, p.710-718, Ago. 2006.
- HOU, C. et al. Immobilized lipase on macroporous polystyrene modified by PAMAM-dendrimer and their enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, Lanzhou, v. 49, n. 2, p.244-249, Fev. 2014.
- JAYAPRAKASH, A.; EBENEZER, P. Investigation on extracellular lipase production by *Aspergillus japonicus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*. **Indian Journal of Science and Technology**, Tamil Nadu, v. 3, n. 2, p.113-117, Fev. 2010.
- JAEPYOUNG C. et al. Chitosan And Glycerophosphate Concentration Dependence Of Solution Behaviour And Gel Point Using Small Amplitude Oscillatory Rheometry, **Food Hydrocolloids**, Montreal, v. 20, n. 6, p. 936-945, Ago. 2006.
- KARRA-CHÂABOUNI, M. et al. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, Sfax, v. 66, n. 2, p.168-177, Out. 2008.

KHARRATA, N. et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, Sfax, v. 46, n. 5, p.1083-1089, Maio 2011.

KNEZEVIC, Z. et al. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal**, Belgrade, v. 30, n. 3, p. 269-278. Jun. 2006.

LEE, Jong Ho et al. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. **Bioresource Technology**, Seoul, v. 102, n. 2, p.2105-2118, Jan. 2011

LI, S. et al. *Pseudomonas cepacia* lipase immobilized onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for biodiesel production from soybean oil. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Tainan, v. 72, n. 2, p.40-45, Out. 2011.

LIMA, U. A. et al. *Biologia Industrial*, v. 3. Editora Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

MANRICH, A. et al. Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 1, n. 43, p.54-61, Jul. 2008.

MANZANO, M. F. G.; IGARZABAL, C. I. A. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthesized hydrogel for hydrolysis reaction. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Córdoba, v. 72, n. 2, p. 28-35, Out. 2011.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

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

MENDES, A. A. et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **J Ind Microbiol Biotechnol**, Sete Lagoas, v. 38, n. 8, p.1055-1066, 2011b.

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

MENONCINI, S. et al. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p.440-443, 2009.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciência Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p.214-234, 2011.

MILASINOVIC, N. et al. Synthesis, characterization and application of poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels as supports for lipase immobilization. **Reactive & Functional Polymers**, Belgrade, v. 70, n. 10, p. 807-814, Out. 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**, 3. ed. p. 189-224, Sarvier, 2002.

NUNES, P.A. et al. Batch operational stability of immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase during acidolysis of virgin olive oil with medium-chain fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, Faro, v. 67, p.265-268, Ago. 2012.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, Lorena, v. 23, n. 5, p.632-636, Out. 2000.

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

PALOMO, J. M. et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal Of Molecular Catalysis**, Madrid. V. 19, p. 279- 286, Dez. 2002.

PAULA, A. V. et al. Comparação do desempenho da lipase de *candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, Lorena, v. 31, n. 1, p.35-40, 2008.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 145–150, 2002.

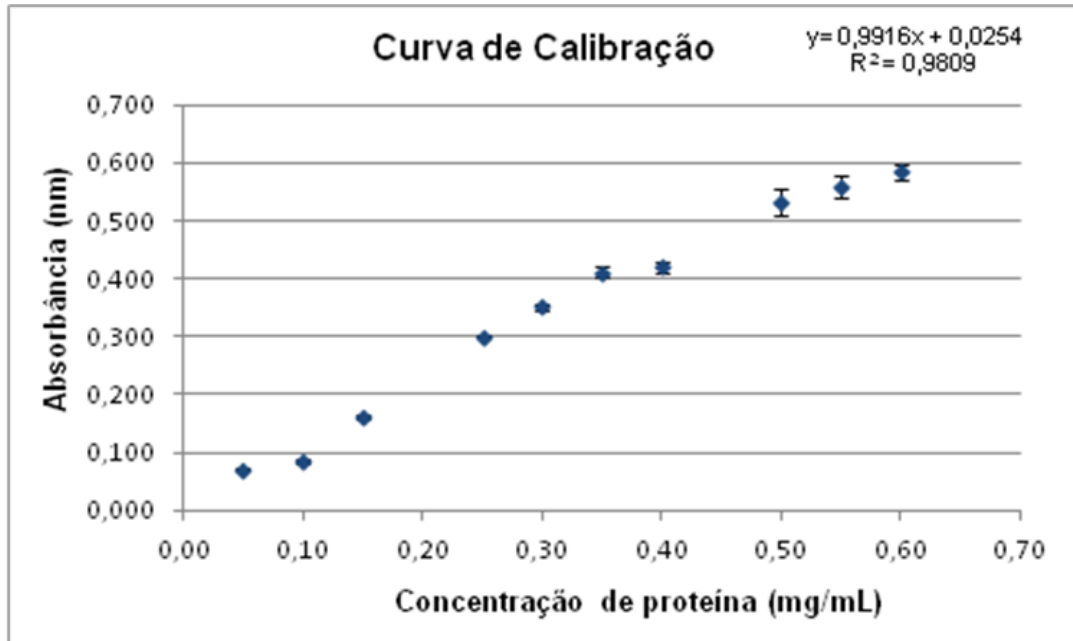
RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, São Carlos, v. 51, n. 4, p.100-109, Abr. 2008.

SAID, S.; PIETRO, R.. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SANTOS, R. R. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

- SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal Microbiology Methodology**, New Delhi, v. 52, n. 1, p. 1-18, Jan. 2003.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Punjab, v. 19, p.627-662, 2001.
- SEBRÃO, D. et al. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Quimica Nova**, Florianópolis, v. 35, n. 5, p.1182-1187, Out. 2007.
- SILVA, G. S. et al. Chitosan/Siloxane Hybrid Polymer: Synthesis, Characterization and Performance as a Support for Immobilizing Enzyme. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, Lorena, v. 22, n. 8, p.1407-1417, Ago. 2011.
- SILVA, J.a. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, Fortaleza, v. 60, p.16-24, Jan. 2012.
- SIMÕES, A. S. et al. Desempenho da matriz híbrida SiO_2 -quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Quimica Nova**, Lorena, v. 34, n. 1, p.33-38, 2010.
- SOARES, C. M. F. et al. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Lorena, v. 77, p.745-757, 1999.
- TAN, Y.L. et al. Effect of linoleic-acid modified carboxymethyl chitosan on bromelain immobilization onto self-assembled nanoparticles. **Front. Mater**, Qingdao, v. 2, n. 2, p.209–213, 2008.
- TECELÃO, C. et al. Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. **Biochemical Engineering Journal**, Peniche, v. 67, p.104-110, Ago. 2012.
- WU, J.; SU, Z.; MA, G. A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. **International Journal Of Pharmaceutics**, Beijing, v. 315, n. 2, p. 1-11, Jun. 2006.
- YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, Ontario v. 23, n. 7, p. 438–450, Nov. 1998.
- ZHANG, Y. W.; PRABHU, P; LEE, J. K. Immobilization of *Bacillus licheniformis* L-arabinose isomerase for semi-continuous L-ribulose production. **Bioscience Biotechnology And Biochemistry**, v.73, n. 10, p.2234-2239, Out. 2009.
- ZHOU, J. Q.; WANG, J. W. Immobilization of alliinase with a water soluble–insoluble reversible N-succinyl-chitosan for allicin production. **Enzyme And Microbial Technology**, Suzhou, v. 45, n. 7, p.299-304, Out. 2009.

APÊNDICE A - Curva de calibração para determinação do teor de proteína



APÊNDICE B – Análise da Variância (ANOVA) para regressão do modelo que representa a atividade hidrolítica em função da temperatura e pH da lipase imobilizada por LC usando planejamento central 2² estrela rotacional

Variável	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados médios	F	p
X ₁ (Linear)	65405,8	1	65405,8	16,45252	0,027003*
X ₁ (Quadrático)	32512,3	1	32512,3	8,17830	0,064589
X ₂ (Linear)	13200,6	1	13200,6	3,32055	0,165950
X ₂ (Quadrático)	12037,1	1	12037,1	3,02787	0,180222
X ₁ X ₂	1695,4	1	1695,4	0,42646	0,560312
Falta de Ajuste	139741,8	3	46580,58	11,71712	0,036538*
Erro Puro	11926,3	3	3975,43		

*significativo ao nível de 95% de confiança

X₁ e X₂ representam as variáveis: pH e Temperatura, respectivamente