



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE TIPO B  
DE *Candida antarctica* UTILIZANDO FIBRA DA  
CASCA DE COCO VERDE COMO SUPORTE**

*Ana Iraidy Santa Brígida*

FORTALEZA – CE

2006

ANA IRAIDY SANTA BRÍGIDA

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE TIPO B DE *Candida antarctica*  
UTILIZANDO FIBRA DA CASCA DE COCO VERDE COMO SUPORTE

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA – CE

2006

B864e Brígida, Ana Iraidy Santa  
Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra da casca de coco verde como suporte / Ana Iraidy Santa Brígida .  
177 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) –  
Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia  
Química, Fortaleza, 2006.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Rocha B. Gonçalves

1. Lipase 2. Coco verde 3. Imobilização de enzimas  
4. Resíduo agroindustrial I.Gonçalves, Luciana Rocha B.  
II.Universidade Federal do Ceará III. Título

CDD 660

ANA IRAIDY SANTA BRÍGIDA

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE TIPO B DE *Candida antarctica*  
UTILIZANDO FIBRA DA CASCA DE COCO VERDE COMO SUPORTE

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Luciana Rocha Gonçalves Barros (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dra. Maria Alice Zarur Coelho  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dra. Andréa Lopes de Oliveira Ferreira  
Universidade Federal do Ceará

---

Pesquisador Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto  
Embrapa Agroindústria Tropical

Dedico este trabalho à minha mãe por tudo que  
ela foi, é, e sempre será na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

E de repente olhamos para trás e nos perguntamos: Quantos passos foram dados até aqui? É quando percebemos que tudo não seria possível se não fosse pela existência de uma seqüência, nem sempre lógica, de acontecimentos e ações provocados por si e outros, ou justificados pelo acaso. É quando nos perguntamos: Quem é esta força maior que nos tornou presente, vida? É quando entendemos que jamais conseguiríamos ser hum sem fazer parte de um todo. Por isso, nada mais justo do que iniciar agradecendo Aquele que foi, é e sempre será a razão de estarmos aqui, Deus. A Ele agradeço por tudo, porque foi o conjunto de tudo que me foi permitido que tornou possível a conclusão deste trabalho. Agradeço também:

À minha mãe, por lutar comigo, pelo estímulo nas horas difíceis, pela paciência nos meus momentos de estresse e pelo imenso amor que é a fonte de minha força.

Ao meu pai, que mesmo longe, ao seu modo, me deu apoio em tudo que me destinei a fazer até então.

À Professora Luciana, pela palestra no 1º ano de graduação que me fez me encontrar na Engenharia Química ... e cá estou, pelos ensinamentos, pela orientação do trabalho, pelas palavras amiga e por toda confiança dedicada a mim.

À Morsy, pela grande amizade, pelo exemplo de profissional humano, objetivo e lutador e pelo apoio dado a este trabalho desde sua concepção, o qual é uma ramificação de uma causa por ela abraçada a tempos – o desenvolvimento de alternativas para o resíduo da agroindústria do coco verde.

À Vivi, por ser a fonte de uma “fibra” única que durante este caminhar foi de singular importância para mim, pela ajuda na construção de um Ser mais Humano e do entendimento do mestre Maestro e pelas discussões do que é científico.

Aos Pesquisadores da Embrapa Agroindústria Tropical, Gustavo e Laura, pelo apoio à pesquisa e pela amizade.

À Fátima e Terezinha, pelo apoio, ensinamento e grande amizade no início de tudo... A semente brotou, virou árvore. Quem sabe um dia colheremos juntas os frutos.

Aos colegas da turma de mestrado, pela amizade.

À Djavânia, pela amizade impar durante esses dois anos de mestrado compartilhados.

Ao Álvaro, por me ajudar a realizar as atividades no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, pelas horas de convívio, pela amizade e pelas mobilizações para ajudar no árduo processo de seleção das fibras.que iriam ser usadas.

À Andrea, por toda a ajuda neste breve tempo de convivência.

À Dasciana e ao Wellington, pela amizade e pela força.

Ao GPSA, por permitirem o uso do titoprocessador automático durante todo este estudo.

Ao Moisés Neto, pelas análises no Autosorb.

À Celli Muniz, pelas análises de microfotografias no MEV da Embrapa Agroindústria Tropical.

Aos professores e aos funcionários do Departamento de Engenharia Química da UFC pelo apoio.

À FUNCAP, pela bolsa concedida.

Em sumo, a todos aqueles que contribuíram, ou acompanharam este processo de formação, pesquisa e desenvolvimento pessoal, intelectual e científico, os meus sinceros agradecimentos. E já dizia um velho ditado, “uma andorinha só não faz verão”.

“Deve-se investigar não o que os outros pensaram  
ou o que nós próprios suspeitamos,  
mas aquilo que podemos ter uma intuição  
clara e evidente,  
ou que podemos deduzir com certeza, pois  
de outro modo não se adquire a ciência.”

***René Descartes***



## RESUMO

Em face à busca por novos suportes de baixo custo para imobilização de enzimas e à procura por alternativas de aproveitamento para a casca de coco verde, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da utilização da fibra da casca de coco verde como suporte para imobilização de enzimas, em específico a lipase do tipo B de *Candida antarctica*. Foram testadas duas técnicas de imobilização, adsorção e ligação covalente. As variáveis estudadas no processo de imobilização por adsorção foram: concentração inicial de enzima, tempo de contato, pH do meio de imobilização e pH da superfície da fibra. Para concentrações iniciais de enzima no sobrenadante até 150 U/mL, o tempo de contato de 2 horas foi suficiente para imobilização. Um derivado bastante estável foi obtido fazendo uso de uma solução inicial de enzima contendo 40 U/mL, em tampão fosfato a pH 7, para imobilização em fibra de coco lavada com água (pH da superfície = 5), sendo o tempo de contato igual a 2 horas. O fator de estabilização térmica a 60°C foi igual a 92,15 e os valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  da enzima imobilizada foram iguais aos da enzima na forma solúvel. Além disso, observou-se que a fibra possui caráter iônico, sendo o processo de adsorção influenciado pelo pH do meio de imobilização. Quanto ao processo de imobilização por ligação covalente, as variáveis estudadas foram concentração inicial de enzima, tempo de contato, pH do meio de imobilização, uso de aditivos durante o processo de imobilização e uso de borohidreto de sódio como agente redutor das bases de Schiff. Observou-se a formação de multicamadas quando se imobilizou a enzima a partir de uma solução contendo 280 U/mL. A presença de ácido butírico e PEG 6.000 durante o processo de imobilização não tiveram influência significativa sobre a atividade hidrolítica do derivado e sobre a conversão de ácido butírico na reação de síntese. O uso de borohidreto de sódio como agente redutor resultou em derivados menos ativos e mais instáveis tanto no processo de imobilização a pH 7 quanto em pH 10. Comparando a imobilização a pH 7 com a imobilização a pH 10, maior carga enzimática imobilizada, maior estabilidade operacional de síntese e maior estabilidade à estocagem foram obtidos com derivado imobilizados em pH 7. Num paralelo entre imobilização por ligação covalente e por adsorção, concluiu-se que para meios aquosos, derivados obtidos por ligação covalentes são mais adequados, contudo, para reações em meios orgânicos a imobilização por adsorção é mais indicada por ser uma técnica simples, de baixo custo e que promove derivado bastante estável. Por fim, buscando aumentar a área superficial e caracterizar o suporte estudado, foram realizados estudos investigativos da morfologia da superfície da fibra e suas modificações por tratamentos químicos.

Palavras-chave: Imobilização de enzimas, Lipase, Coco verde, Resíduo agroindustrial.

---

## ABSTRACT

For the last few years, many researches have sought for inexpensive support matrixes to enzyme immobilization. Meanwhile, in Brazil, an effort is being made to find alternative uses to green coconut husk, an agroindustrial waste. Therefore, the present study investigates the feasibility of using green coconut fiber for the immobilization of *Candida antarctica* lipase B. Two immobilization strategies were investigated: adsorption and covalent attachment. The effect of different variables on adsorption process have been studied, such as: lipase loading, contact time, pH of the coupling media and pH of the support surface. A stable immobilized enzyme was obtained by contacting coconut fiber washed with water (surface pH = 5) with an enzyme solution containing 40 U/mL in sodium phosphate buffer (pH 7.0) for 2h at room temperature. The thermal stabilization factor at 60°C was 92.15. Kinetic parameters for Michaelis-Menten model ( $K_m$  and  $V_{m\acute{a}x}$ ) were the same for both immobilized enzyme and soluble enzyme. It was also observed that coconut fiber is an ion exchange material because of the influence of the coupling media pH on adsorption. Afterwards, we have studied the effect of some variables on the covalent immobilization on coconut fiber activated with GPTMS, such as: lipase loading, contact time, pH of the coupling media, use of additives during the immobilization and sodium borohydride as reducing agent of the Schiff's bases formed on the covalent attachment. It was observed that a high enzyme loading, for instance 280 U/mL of initial enzyme concentration on the supernatant, promoted a multilayer immobilization. The effect of butyric acid and PEG 6.000, both used as additives during immobilization, were not significant on hydrolytic activity or butyric acid conversion. The use of sodium borohydride as a reducing agent of the Schiff's bases promoted a loss on the immobilized enzyme activity. Moreover, the immobilized enzyme obtained after the reduction was less stable considering thermal stability in all the cases studied. Best results of enzyme loading, operational stability of synthesis and storage stability were obtained when the enzyme was immobilized covalently at pH 7. Drawing a comparison between adsorption and covalent attachment, results allow concluding that, for aqueous media reactions, the use of immobilized enzyme by covalent attachment is more indicated. However, the immobilization by adsorption a suitable method for organic media reactions, since it is cheaper and a very stable immobilized enzyme is obtained. Finally, searching to increase the surface area of the support and to characterize it, some studies have been made on the fiber morphologic characteristics and on its modifications after each treatment.

Keywords: Enzyme immobilization, Lipase, Green coconut, Agroindustrial waste.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Símbolo	Descrição	Unidade
$\alpha_1$	Taxa de atividade específica para o estado 1	-
$\alpha_2$	Taxa de atividade específica para o estado 2	-
ANOVA	Análise de variância	-
CAL B	Lipase tipo B de <i>Candida antarctica</i>	-
Ce	Concentração de equilíbrio	U/mL
E <sub>0</sub>	Concentração inicial de enzima	U/mL
F	Fator de estabilização	-
GPTMS	3-glicidoxipropil trimetoxisilano	-
k <sub>1</sub>	Coeficiente de desativação para o estado 1	-
k <sub>2</sub>	Coeficiente de desativação para o estado 2	-
$\lambda$	Comprimento de onda	nm
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten	mM
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura	-
PEG	Polietileno glicol	-
SDS	Dodecil sulfato de sódio	-
V <sub>0</sub>	Velocidade inicial da reação	mM/min
V <sub>máx</sub>	Velocidade máxima da reação	mM/min
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia vida	h

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1:	Evolução do número de processos biocatalisados, em escala industrial, ao longo das últimas décadas. ....	5
Figura 2.2:	Classificação dos principais métodos de imobilização de enzimas. ....	9
Figura 2.3:	Influência da concentração de substrato na velocidade inicial de reação catalisada por enzimas. ....	19
Figura 2.4:	Influência da temperatura na velocidade de reações catalisadas por enzimas. ....	20
Figura 2.5:	Reações catalisadas por lipases. ....	23
Figura 2.6:	Formato da cavidade ligante de lipase tipo B de <i>Candida antarctica</i> e de <i>Pseudomonas cepacia</i> ....	30
Figura 2.7:	Produção mundial de coco nos últimos anos ....	32
Figura 2.8:	Produção brasileira de coco nos últimos anos ....	33
Figura 2.9:	Alternativas de uso do coco maduro ....	34
Figura 2.10:	Produção brasileira de coco verde e maduro em 1999 ....	37
Figura 3.1:	Fluxograma do processo de obtenção da fibra de casca de coco verde ....	44
Figura 3.2:	Esquema do aparato utilizado nos ensaios de imobilização ....	45
Figura 3.3:	Reação de hidrólise do butirato de metila ....	46
Figura 3.4:	Processo de funcionalização da fibra de casca de coco verde com 3-glicidoxipropil trimetoxisilano (GPTMS) ....	56
Figura 3.5:	Reação entre grupos aldeídos (suporte) e aminas (enzima) para formação do complexo suporte-enzima ....	60
Figura 4.1:	Avaliação da conversão de ácido butírico em função do tempo na síntese de butirato de butila a 37°C catalisada por lipase imobilizada em fibra de coco verde.....	71
Figura 4.2:	Influência da temperatura de reação na conversão de ácido butírico durante síntese de butirato de butila catalisada por lipase imobilizada em fibra de coco verde.....	72

---

Figura 4.3:	Influência da concentração inicial dos substratos na conversão de ácido butírico para síntese de butirato de butila catalisada por lipase imobilizada em fibra de coco verde, a 30°C por 24h.....	73
Figura 4.4:	Microfotografia de uma fibra de coco (a) bruta e (b) funcionalizada com GPTMS, aumento de 2000 x.....	75
Figura 4.5:	Variação da concentração de proteína no sobrenadante em função do tempo durante a imobilização por adsorção de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> , a pH 7,0 e temperatura ambiente.....	78
Figura 4.6:	Variação da atividade enzimática no derivado em função do tempo durante a imobilização por adsorção de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> , a pH 7,0 e temperatura ambiente.....	79
Figura 4.7:	Variação da atividade hidrolítica no sobrenadante em função do tempo durante a imobilização por adsorção de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> , a pH 7,0 e temperatura ambiente.....	79
Figura 4.8:	Atividade aparente adsorvida na fibra do coco após a imobilização por adsorção de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> , a pH 7,0 e temperatura ambiente, para diferentes concentrações de enzima.....	81
Figura 4.9:	Variação da atividade enzimática no derivado obtido a partir de imobilização por adsorção utilizando diferentes concentrações iniciais de enzima, pH 7,0 e temperatura ambiente.....	82
Figura 4.10:	Variação dos valores de atividade recuperada e rendimento de imobilização obtidos na imobilização por adsorção utilizando diferentes concentrações iniciais de enzima, pH 7,0 e temperatura ambiente.....	82
Figura 4.11:	Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco por adsorção, a pH 7, para diferentes concentrações iniciais de enzima.....	85
Figura 4.12:	Valores de atividade de lipase imobilizada em fibra de coco verde por adsorção, a temperatura ambiente, em função do pH do meio dispersante.....	86
Figura 4.13:	Cargas da fibra de coco verde e da lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> a diferentes valores de pH .....	87
Figura 4.14:	Atividade recuperada e rendimento do processo de imobilização de lipase em fibra de coco verde por adsorção, a temperatura ambiente, para diferentes valores de pH.....	88

Figura 4.15:	Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco por adsorção, cuja concentração inicial de enzima foi 40 U/mL, para diferentes valores de pH do meio de imobilização. ....	89
Figura 4.16:	Influência da concentração de substrato na velocidade inicial de reação de hidrólise de butirato de metila, em pH 7,0 e temperatura ambiente, catalisada por lipase em solução e imobilizada em fibra de casca de coco verde.....	90
Figura 4.17:	Perfil da estabilidade operacional de lipase imobilizada em fibra de coco por adsorção, a pH 7 e temperatura ambiente, baseado na hidrólise de butirato de metila.....	92
Figura 4.18:	Perfil da estabilidade operacional de lipase imobilizada em fibra de coco por adsorção, a pH 7 e temperatura ambiente, baseado na síntese de butirato de n-butila, a partir de concentrações equimolares de ácido butírico e butanol, em meio orgânico.....	93
Figura 4.19:	Perfil de desativação térmica a 50°C de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> na forma solúvel e imobilizada em fibra de coco verde por adsorção. ....	94
Figura 4.20:	Perfil de desativação térmica a 60°C de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> na forma solúvel e imobilizada em fibra de coco verde por adsorção.....	95
Figura 4.21:	Atividade do derivado obtido a partir da imobilização de diferentes concentrações iniciais de enzima em fibra de coco por ligação covalente a pH 7.....	99
Figura 4.22:	Atividade recuperada e rendimento de imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco verde por ligação covalente em pH 7 para diferentes concentrações iniciais de enzima .....	100
Figura 4.23:	Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco por ligação covalente, a pH 7, para diferentes concentrações iniciais de enzima .....	101
Figura 4.24:	Atividade hidrolítica no derivado após um dado tempo de imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco por ligação covalente a pH 7.....	102
Figura 4.25:	Atividade hidrolítica no derivado após um dado tempo de imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco por ligação covalente a pH 10 ( $E_0 = 80$ U/mL).....	103

---

Figura 4.26:	Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pelo modelo linear proposto para o estudo da influência de três variáveis na imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente a pH 7 tendo como variável resposta a atividade hidrolítica do derivado obtido.....	106
Figura 4.27:	Estabilidade operacional de hidrólise de butirato de metila, a pH 7,0 e temperatura ambiente, catalisada por lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 7, na ausência ou presença de diferentes aditivos. ....	108
Figura 4.28:	Estabilidade operacional de lipase do tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 10, na presença de ácido butírico, avaliada através de ciclos subseqüentes de síntese de butirato de butila em meio orgânico a 30°C.....	111
Figura 4.29:	Estabilidade térmica a 60°C da lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 10, na presença de ácido butírico .....	112
Figura 4.30:	Estabilidade térmica a 60°C de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada em fibra de coco por ligação covalente em diferentes valores de pH .....	113
Figura 4.31:	Estabilidade operacional de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 7 e pH 10, avaliada através de ciclos subseqüentes de síntese de butirato de butila em meio orgânico a 30°C.....	114
Figura 4.32:	Estabilidade operacional de lipase do tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 7 e pH 10, avaliada através de ciclos subseqüentes de hidrólise de butirato de metila a temperatura ambiente.....	115
Figura 4.33:	Estabilidade à estocagem sob refrigeração de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada em fibra de coco por ligação covalente em diferentes valores de pH .....	116
Figura 4.34:	Influência da concentração de borohidreto de sódio na atividade do derivado obtido a partir da imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco, por ligação covalente .....	117
Figura 4.35:	Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco, por ligação covalente, a pH 7, com ou sem o uso de borohidreto de sódio após a imobilização.....	118

Figura 4.36:	Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco, por ligação covalente, a pH 10, com ou sem o uso de borohidreto de sódio após a imobilização.....	119
Figura 4.37:	Estabilidade à estocagem sob refrigeração de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada em fibra de coco verde por ligação covalente a diferentes valores de pH .....	120
Figura 4.38:	Estabilidade à estocagem sob refrigeração de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> imobilizada em fibra de coco verde por ligação covalente a diferentes valores de pH, medida a partir da hidrólise de butirato de metila a pH 7,0 e temperatura ambiente .....	121
Figura 4.39:	Influencia da concentração inicial de enzima no rendimento de imobilização e na atividade recuperada dos biocatalisadores obtidos neste trabalho por adsorção e por ligação covalente, em pH 7,0 e a temperatura ambiente .....	123
Figura 4.40:	Influencia da concentração inicial de enzima presente no sobrenadante na atividade enzimática nos derivados obtidos neste trabalho por adsorção e por ligação covalente, em pH 7,0 e a temperatura ambiente.....	123
Figura 4.41:	Estabilidade operacional dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco, por adsorção e por ligação covalente a pH 7, medida através de ciclos consecutivos de reação de hidrólise de butirato de metila a pH 7,0 e temperatura ambiente.....	124
Figura 4.42:	Estabilidade operacional de síntese dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco, por adsorção e por ligação covalente, a pH 7 ou pH 10.....	125
Figura 4.43:	Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase de <i>C. antarctica</i> em fibra de coco, por adsorção e por ligação covalente a pH 7 e pH 10 .....	126
Figura 4.44:	Imagem da amostra selecionada para observação através do MEV, obtida com aumento de 10 x, mostrando a sua heterogeneidade em relação ao diâmetro das fibras.....	128
Figura 4.45:	Imagem da sessão transversal de uma fibra de coco verde funcionalizada com GPTMS (a) obtida com aumento de 100 x e (b) obtida com aumento de 350 x, focando a sessão transversal da fibra .....	129
Figura 4.46:	Imagem de uma fibra natural, obtida com aumento de 450 x, mostrando a presença de partículas sólidas.....	130



Figura 4.47:	Detalhe de protuberância formada por ácidos graxos e ceras em contraste a um orifício natural da fibra sem a presença destes, aumento de 2.000 x.....	130
Figura 4.48:	Imagem da superfície de uma fibra de coco verde lavada com água, obtida com aumento de 500 x.....	131
Figura 4.49:	Imagem da superfície de uma fibra de coco verde lavada com SDS, obtida com aumento de 1000 x.....	131
Figura 4.50:	Imagem da superfície de uma fibra de coco verde tratada com clorito de sódio obtida com aumento de 200 x.....	132
Figura 4.51:	Micrografia da epiderme externa da casca de arroz após pré-tratamento com clorito de sódio .....	132
Figura 4.52:	Superfície de uma fibra de coco verde tratada com clorito de sódio e 10% de NaOH, obtida com aumento de 1000 x.....	133
Figura 4.53:	Imagem de uma fibra de coco submetida a uma solução 5% de NaOH por 72h.....	133
Figura 4.54:	Fibra de coco verde (a) lavada com água e (b) oxidada com peróxido de hidrogênio.....	135
Figura 4.55:	Microfotografia de uma fibra de coco submetida a oxidação com peróxido de hidrogênio, obtida com aumento de 1000 x.....	135
Figura B.1:	Configuração esquemática da parte interna de um microscópio eletrônico de varredura .....	161
Figura B.2:	Metalizador EMITECH, modelo K 550, utilizado para recobrimento da amostra com ouro.....	161
Figura B.3:	Microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo DSM 940A, utilizado nas análises de microscopia eletrônica do suporte e/ou do derivado.....	162
Figura D.1:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando não haver interação entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 16,79999).....	165
Figura D.2:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando duas interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 8,19242).....	166

Figura D.3:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando três interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 11,85961).....	166
Figura D.4:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando não haver interação entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 2,124492).....	168
Figura D.5:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando duas interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 3,085172).....	169
Figura D.6:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando três interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 3,776751).....	169
Figura D.7:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando não haver interação entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 11,7324).....	171
Figura D.8:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando duas interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 6,650917).....	172
Figura D.9:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando três interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 3,49935).....	172
Figura D.10:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando não haver interação entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 36,64132).....	174

---

Figura D.11:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando duas interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 47,78983).....	175
Figura D.12:	Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial $2^3$ para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando três interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 70,50209).....	175
Figura E.1:	Microfotografia de amostra de fibra bruta selecionada para análise, com aumento de 50 x.....	176
Figura E.2:	Detalhe da Figura E.1, aumento de 100 x .....	176
Figura E.3:	Detalhe da Figura E.1 com um aumento de 200 x .....	176
Figura E.4:	Detalhe da Figura E.1, aumento de 500 x.....	176
Figura E.5:	Imagem de outro ponto da amostra de fibra bruta selecionada para análise, com aumento de 200 x .....	177
Figura E.6:	Imagem de outra amostra de fibra selecionada para análise, com aumento de 200 x .....	177

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1:	Comparação entre catalisadores químicos e catalisadores biológicos .....	7
Tabela 2.2:	Propriedades físicas e químicas da fibra de coco maduro .....	35
Tabela 2.3:	Propriedades físico-químicas e químicas do pó de coco maduro...	36
Tabela 2.4:	Níveis de fenólicos ligados à parede celular na casca de coco verde .....	38
Tabela 2.5:	Caracterização química da casca de coco verde .....	39
Tabela 2.6:	Propriedades físicas e químicas da fibra de coco verde .....	40
Tabela 2.7:	Características químicas do pó de coco verde como substrato .....	40
Tabela 3.1:	Especificações dos lotes de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> utilizados. ....	43
Tabela 3.2:	Níveis das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para imobilização a pH 7 e 10 .....	62
Tabela 3.3:	Matriz de planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para imobilização a pH 7 e pH10 com os coeficientes de contrastes .....	62
Tabela 4.1:	Etapas desenvolvidas no estudo do potencial da fibra de coco verde como suporte .....	69
Tabela 4.2:	Influência do pré-tratamento da fibra na atividade enzimática do biocatalisador obtido por imobilização de lipase por adsorção.....	76
Tabela 4.3:	Características dos derivados obtidos após imobilização de lipase tipo B de <i>Candida antarctica</i> em fibra de coco verde em diferentes valores pH para a superfície .....	77
Tabela 4.4:	Atividade recuperada e rendimento de imobilização de lipase em fibra de coco verde por adsorção para diferentes concentrações iniciais de enzima, a pH 7,0 e temperatura ambiente.....	80
Tabela 4.5:	Estimativa do erro experimental para as leituras de atividade hidrolítica determinadas a partir da hidrólise de butirato de metila a diferentes concentrações de lipase.....	83

Tabela 4.6:	Parâmetros cinéticos da desativação térmica, a 60°C, da lipase CAL B imobilizada por adsorção em fibra de coco, a pH 7, para diferentes concentrações iniciais de enzima no sobrenadante.....	84
Tabela 4.7:	Parâmetros do estudo de estabilidade térmica a 60°C da lipase imobilizada por adsorção a concentração inicial de enzima de 40 U/mL, para diferentes valores de pH do meio de imobilização. ....	89
Tabela 4.8:	Valores de $K_m$ e $V_{máx}$ de lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> na forma solúvel e na forma imobilizada por adsorção em fibra de coco, obtidos por diferentes métodos .....	91
Tabela 4.9:	Parâmetros cinéticos da desativação térmica da lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> a 50° e 60°C .....	96
Tabela 4.10:	Parâmetros de imobilização para lipase tipo B de <i>C. antarctica</i> , imobilizada em fibra de coco verde sob diferentes condições. Condição 1: Fibra tratada com hexano e CAL B imobilizada na presença de PEG. Condição 2: Fibra sem tratamento com hexano e CAL B imobilizada na presença de PEG. Condição 3: Fibra sem tratamento com hexano e CAL B imobilizada na ausência de PEG .....	97
Tabela 4.11:	Influência da lavagem com hexano do derivado, após imobilização, nos parâmetros de síntese de butirato de butila.....	98
Tabela 4.12:	Parâmetros cinéticos de desativação térmica a 60°C da lipase imobilizada por ligação covalente em fibra de coco funcionalizada, a pH 7, a diferentes concentrações iniciais de enzima.....	101
Tabela 4.13:	Valores de atividade hidrolítica do derivado, atividade recuperada e rendimento de imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente em pH 7 e pH 10.....	104
Tabela 4.14:	Atividade hidrolítica ( $R_1$ ) e conversão de ácido butírico ( $R_2$ ) do derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 7 e temperatura ambiente, utilizando diferentes concentrações iniciais de enzima ( $X_1$ ), de PEG 6.000 ( $X_2$ ) e de ácido butírico ( $X_3$ ) no sobrenadante.....	105
Tabela 4.15:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial $2^3$ tendo como resposta a atividade hidrolítica do derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 7.....	105

Tabela 4.16:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial $2^3$ tendo como resposta a conversão de ácido butírico pelo derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 7. ....	107
Tabela 4.17:	Atividade hidrolítica ( $R_1$ ) e conversão de ácido butírico ( $R_2$ ) do derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 10, para diferentes concentrações iniciais de enzima ( $X_1$ ), de PEG 6.000 ( $X_2$ ) e de ácido butírico ( $X_3$ ) no sobrenadante.....	109
Tabela 4.18:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial $2^3$ tendo como resposta a atividade hidrolítica do derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 10.....	109
Tabela 4.19:	Efeitos calculados para o planejamento fatorial $2^3$ tendo como resposta a conversão de ácido butírico pelo derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 10.....	110
Tabela 4.20:	Parâmetros do estudo de estabilidade térmica a 60°C da lipase imobilizada por ligação covalente em fibra de coco funcionalizada, a pH 7 e pH 10, antes e após o tratamento com borohidreto de sódio .....	119
Tabela 4.21:	Parâmetros do processo de imobilização a pH 7 em fibra de coco submetida a tratamento químico com clorito de sódio em meio ácido.....	133
Tabela 4.22:	Parâmetros do processo de imobilização por adsorção a pH 7 em fibra de coco submetida a tratamento químico com clorito de sódio e 10% de NaOH.....	134
Tabela 4.23:	Parâmetros do processo de imobilização a pH 7 em fibra de coco submetida à oxidação com peróxido de hidrogênio.....	136
Tabela A.1:	Algumas referências bibliográficas de estudos realizados utilizando casca de coco verde e seus derivados para variados fins.....	157
Tabela D.1:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica sem interações ( $R^2 = 0,70972$ ).....	164
Tabela D.2:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica com duas interações ( $R^2 = 0,99517$ ).....	164

Tabela D.3:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica com três interações ( $R^2 = 0,99838$ ).....	165
Tabela D.4:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico sem interações ( $R^2 = 0,82284$ ).....	167
Tabela D.5:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico com duas interações ( $R^2 = 0,92828$ ).....	167
Tabela D.6:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico com três interações ( $R^2 = 0,97968$ ).....	168
Tabela D.7:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica sem interações ( $R^2 = 0,62951$ ).....	170
Tabela D.8:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica com duas interações ( $R^2 = 0,90905$ ).....	170
Tabela D.9:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica com três interações ( $R^2 = 0,98083$ ).....	171
Tabela D10:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico sem interações ( $R^2 = 0,8985$ ).....	173
Tabela D11:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico com duas interações ( $R^2 = 0,97731$ ).....	173
Tabela D12:	ANOVA do planejamento $2^3$ para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico com três interações ( $R^2 = 0,97975$ ).....	174

---

## SUMÁRIO

	página
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 Enzimas: Uma Breve Introdução .....	4
2.1.1 Aplicações Industriais das Enzimas como Biocatalisadores .....	5
2.1.2 Enzimas Imobilizadas .....	8
2.1.2.1 Imobilização por adsorção .....	9
2.1.2.2 Imobilização por ligação covalente .....	10
2.1.2.3 Outras técnicas de imobilização .....	12
2.1.2.4 Suportes para imobilização de enzimas .....	13
2.1.2.5 Estabilidade das enzimas imobilizadas .....	15
2.1.3 Cinética de Reações Biocatalisadas .....	16
2.1.3.1 Fatores que influenciam a velocidade de uma reação biocatalisada .....	17
2.2 Lipases: Biocatalisadores Industriais em Potencial .....	20
2.2.1 Estrutura e Mecanismo de Atuação das Lipases .....	21
2.2.2 Aplicações das Lipases como Biocatalisadores .....	22
2.2.3 Lipases Imobilizadas e as Particularidades de sua imobilização. ....	24
2.2.3.1 Lipases imobilizadas por adsorção .....	25
2.2.3.2 Lipases imobilizadas por ligação covalente .....	27
2.2.4 Lipases tipo B de <i>Candida antarctica</i> .....	29
2.2.4.1 Características específicas da lipase tipo B de <i>Candida antarctica</i> .....	29
2.2.4.2 Aplicações da lipase tipo B de <i>Candida antarctica</i> .....	31
2.3 Coco: Estado da Arte da Cadeia Produtiva .....	32
2.3.1 Coco Maduro .....	34
2.3.2 Coco Verde .....	36



---

<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
3.1 Materiais .....	43
3.1.1 Enzimas .....	43
3.1.2 Suporte .....	43
3.1.3 Reagentes .....	44
3.1.4 Equipamentos .....	45
3.2 Metodologia .....	46
3.2.1 Atividade Hidrolítica .....	46
3.2.2 Reação de Síntese de Butirato de n-Butila .....	47
3.2.3 Determinação do Teor de Proteína .....	49
3.2.4 Imobilização por Adsorção .....	50
3.2.4.1 Pré-tratamento da fibra .....	50
3.2.4.2 Técnica de imobilização por adsorção .....	50
3.2.4.3. Influência da concentração de enzima e do tempo de adsorção na imobilização .....	51
3.2.4.4 Influência do pH do meio no processo de imobilização ....	52
3.2.4.5 Influência do pH da fibra .....	52
3.2.4.6 Efeito da concentração de butirato de metila na atividade de lipase solúvel e imobilizada .....	53
3.2.5 Imobilização por Ligação Covalente .....	55
3.2.5.1 Funcionalização da fibra .....	55
3.2.5.2 Pré-tratamento do suporte com hexano .....	58
3.2.5.3 Efeito da concentração inicial de enzima .....	59
3.2.5.4 Influência do pH de imobilização nas propriedades do biocatalisador .....	59
3.2.6 Estabilidade Térmica e Operacional dos Derivados Obtidos .....	64
3.2.6.1 Estabilidade operacional de hidrólise .....	64
3.2.6.2 Estabilidade operacional de síntese .....	64
3.2.6.3 Estabilidade térmica .....	65
3.2.7 Características Superficiais e Tratamento Químico da Fibra .....	66
3.2.7.1 Oxidação com peróxido de hidrogênio .....	67
3.2.7.2 Tratamento com clorito de sódio .....	67
3.2.7.3 Tratamento com clorito de sódio e hidróxido de sódio .....	67

---

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	69
4.1 Adaptação de Metodologias .....	70
4.1.1 Síntese de Butirato de Butila .....	70
4.1.2 Funcionalização da Fibra de Coco com GPTMS .....	74
4.2 Imobilização por Adsorção .....	75
4.2.1 Pré-tratamento da Fibra .....	76
4.2.2 Influência da Neutralização da Fibra nas Propriedades do Biocatalisador .....	77
4.2.3 Influência da Concentração de Enzimas e do Tempo de Contato na Imobilização .....	77
4.2.4 Influência do pH do Meio no Processo de Imobilização .....	85
4.2.5 Efeito da Concentração de Substrato na Velocidade de Hidrólise de Butirato de Metila Catalisada por Lipase .....	89
4.2.6 Estabilidade da Enzima Imobilizada por Adsorção .....	91
4.2.6.1 Estabilidade operacional .....	91
4.2.6.2 Estabilidade térmica .....	93
4.3 Imobilização por Ligação Covalente .....	96
4.3.1 Pré-Tratamento da Fibra com Hexano .....	96
4.3.1.1 Pré-tratamento da fibra com hexano antes do processo de imobilização.....	96
4.3.1.2 Pré-tratamento da fibra com hexano durante o processo de imobilização.....	97
4.3.1.3 Pré-tratamento da fibra com hexano após o processo de imobilização.....	98
4.3.2 Estudo da Carga Máxima de Enzima .....	99
4.3.3 Influência do pH de Imobilização nas Propriedades do Biocatalisador .....	102
4.3.3.1 Influência do tempo de contato enzima-suporte na imobilização por ligação covalente .....	102
4.3.3.2 Efeito da presença de aditivos .....	104
4.3.3.3 Estabilidade do biocatalisador .....	113
4.3.3.4 Influência do uso de borohidreto de sódio para redução dos grupos remanescentes no suporte após imobilização	116
4.3.3.5 Uso de hexano como meio dispersante para estocagem..	121
4.4 Um Paralelo entre Imobilização por Adsorção e por Ligação Covalente .....	122

---

4.4.1 Desempenho dos Processo de Imobilização .....	122
4.4.2 Estabilidade dos Derivados Obtidos .....	124
4.5 Breve Estudo Morfológico da Superfície da Fibra de Coco Verde.....	127
4.5.1 Fibra Natural: Aspectos e Variedades .....	128
4.5.2 Remoção de Impurezas: Algumas Tentativas de Tratamentos Químicos .....	131
4.5.2.1 Fibra tratada com clorito de sódio em meio ácido.....	131
4.5.2.2 Fibra tratada com clorito de sódio e hidróxido de sódio.....	133
4.5.2.3 Fibra tratada com peróxido de hidrogênio .....	134
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>137</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>140</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>142</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>157</b>
A.1 ALTERNATIVAS DE APROVEITAMENTO DO RESÍDUO CASCA DE COCO VERDE .....	157
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>160</b>
B.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NA OBTENÇÃO DE FOTOGRAFIAS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	160
B.2 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	162
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>163</b>
C.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL E DISTRIBUIÇÃO DE POROS DAS FIBRAS UTILIZADAS COMO SUPORTE .....	163
<b>APÊNDICE D .....</b>	<b>164</b>
D.1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 7 CONSIDERANDO A VARIÁVEL ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO DERIVADO.....	164

---

D.2 GRÁFICO DOS RESÍDUOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 7 CONSIDERANDO A VARIÁVEL ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO DERIVADO.....	165
D.3 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 7 CONSIDERANDO A VARIÁVEL CONVERSÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO.....	167
D.4 GRÁFICO DOS RESÍDUOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 7 CONSIDERANDO A VARIÁVEL CONVERSÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO.....	168
D.5 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 10 CONSIDERANDO A VARIÁVEL ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO DERIVADO.....	170
D.6 GRÁFICO DOS RESÍDUOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 10 CONSIDERANDO A VARIÁVEL ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO DERIVADO.....	171
D.7 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 10 CONSIDERANDO A VARIÁVEL CONVERSÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO.....	173
D.8 GRÁFICO DOS RESÍDUOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 10 CONSIDERANDO A VARIÁVEL CONVERSÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO.....	174
<b>APÊNDICE E</b> .....	176
E.1 MICROFOTGRAFIAS DE FIBRAS DE COCO VERDE OBTIDAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	176

---

# 1 INTRODUÇÃO

A aplicação industrial de enzimas – tipo especial de proteínas produzidas dentro das células dos organismos vivos que apresentam atividade catalítica – foi impulsionada com o aumento da preocupação com as questões ambientais, com a qualidade do produto e com a redução dos gastos em setores industriais. Assim, a tecnologia enzimática surgiu como uma alternativa para a substituição gradual de processos químicos por processos biocatalisados, uma vez que estes últimos possuem menor impacto ambiental e são mais limpos. Esta característica é devida à elevada especificidade de algumas enzimas, de maneira que as reações secundárias são mínimas ou inexistentes, evitando a formação de subprodutos indesejáveis. Contudo, questões como custo de obtenção de enzimas e a sensibilidade de algumas a altas temperaturas e/ou a variações bruscas das condições operacionais tornam determinados processos inviáveis. Na tentativa de superar tais entraves, estudos têm buscado alternativas que promovam maior estabilidade, maior atividade e recuperabilidade das enzimas, bem como o desenvolvimento de processos de obtenção com menor custo. Para alcançar tais objetivos, destaca-se o uso da tecnologia de genes recombinantes na produção de enzimas que apresentem novas atividades e encontrem-se adaptadas a novas condições de processo (KIRK, BORCHERT e FUGLSANG, 2002), e também, a imobilização de enzimas a qual fornece biocatalisadores de fácil recuperação e/ou reuso, mais estáveis e com maior seletividade (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988).

Dentre as enzimas aplicadas industrialmente, destacam-se as lipases, que catalisam não só a hidrólise como também a síntese de ésteres formados de glicerol e longas cadeias de ácidos graxos. Na função de hidrolase, a lipase pode ser usada na formulação de detergentes, fabricação de alimentos, produção de papel, produção de aromas em queijos e no tratamento de efluentes. Enquanto que na função de sintetases, elas são aplicadas, principalmente, em reações que exijam sua enantioseletividade, como na produção de aminas quirais (JAEGER e REETZ, 1998). Lipases são encontradas em plantas, exemplo da espécie *Vernonia galamensis* (NCUBE e READ, 1995), no pâncreas suíno, além de serem produzidas

---

por muitos microrganismos, tais como, *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger* etc. Para o uso comercial, a fonte de obtenção é, normalmente, a partir de microrganismos, por meio de fermentação submersa ou semi-sólida (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

O aumento no número de aplicações de lipases em síntese e biotransformações impulsionaram estudos de imobilização destas enzimas por diversas técnicas e em diferentes suportes. Adsorção e/ou precipitação em materiais hidrofóbicos e em resina de troca iônica macroporosa, ligação covalente, imobilização em géis e microencapsulamento em vesículas de lipídios são exemplos das diferentes técnicas e suportes aplicados na imobilização de lipases. A imobilização destas enzimas, além de possibilitar o reuso do biocatalisador, pode melhorar a estabilidade e a atividade da enzima, especialmente na presença de solventes orgânicos (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

A variedade de suportes utilizados para imobilização de lipases é notória, destacando-se a imobilização de lipase em poli(propileno), poli(metil-metacrilato), poli(estireno), poli(cloreto de vinila), quitosana, quitina e resina aniônica (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). Tal variedade é consequência da quantidade de estudos que estão sendo realizados objetivando a imobilização de lipases, tamanho interesse industrial que a mesma vem despertando.

Durante o desenvolvimento de um protocolo de imobilização, além da escolha da técnica de imobilização a ser utilizada, deve-se atentar para escolha do suporte. Frente aos diversos suportes estudados para imobilização de enzimas, os resíduos agroindustriais têm se apresentado como uma fonte de matéria-prima de baixo custo. O uso dos mesmos vem, além de gerar um produto de alto valor agregado, reduzir os custos de produção de enzimas imobilizadas. Para imobilização de lipases, destaca-se o uso de casca de arroz (CASTRO, LIMA e ROBERTO, 2001) e de celulignina de madeira (GOMES *et al.*, 2005).

Dentre os diversos resíduos da agroindústria brasileira, pode-se citar a casca de coco verde, cuja origem é a indústria da água de coco. Atualmente, este material – proveniente, principalmente, da orla marítima e de agroindústrias processadoras de água de coco – é destinado a lixões e aterros, reduzindo a vida útil dos mesmos já que a casca é um material volumoso e de degradação lenta. Considerando que se tem observado um aumento crescente no mercado brasileiro de água de coco e que

---

a minimização da geração deste resíduo (casca de coco verde) implicaria na redução da atividade produtiva associada, o seu aproveitamento torna-se uma necessidade. Desta feita, esforços na busca por alternativas de aproveitamento deste resíduo têm sido realizados, principalmente em aplicações agrônômicas.

Neste contexto, o presente trabalho, parte de uma linha de pesquisa recentemente iniciada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará que visa a imobilização de enzimas em matérias-primas regionais, insere-se como uma alternativa de aproveitamento de tal resíduo agroindustrial contribuindo para aumentar a competitividade da cadeia produtiva do coco verde, em consonância com os princípios e objetivos do desenvolvimento sustentável. O objetivo geral da presente dissertação foi avaliar o potencial da utilização da fibra da casca de coco verde como suporte para imobilização de enzimas, em específico a lipase do tipo B de *Candida antarctica*. Para tanto, fez-se uso de duas técnicas de imobilização, adsorção e ligação covalente, através das quais se avaliou a influência de algumas variáveis no processo de imobilização buscando a obtenção de protocolos de imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco verde. Além disso, estudos investigativos de características da superfície da fibra e suas modificações foram realizados. Por fim, a partir deste estudo de caráter pioneiro, haja vista que até o presente momento não haviam sido reportados estudos de imobilização de enzimas em fibra de coco verde, buscou-se gerar dados técnicos para oferecer uma alternativa de aproveitamento de um resíduo agroindustrial, além de contribuir para a expansão e diversificação da tecnologia enzimática, trazendo potenciais benefícios sócio-econômicos através do desenvolvimento de uma tecnologia inovadora.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O início de uma pesquisa dá-se a partir de idéias, que têm como principais fundamentações as observações do cotidiano, estudos previamente realizados, teorias e hipóteses pré-estabelecidas. Neste intuito, o presente capítulo visa instrumentar o leitor com as principais bases teóricas que envolvem esta pesquisa, bem como promover uma visão da atual conjuntura dos objetos de estudo da presente dissertação. Assim, o capítulo abordará inicialmente a definição de enzimas e sua aplicação industrial como biocatalisadores, tanto na forma solúvel quanto na forma imobilizada. Posteriormente, tratar-se-á especificamente de lipases, dando destaque a lipase tipo B de *Candida antarctica*. E finalmente, mostrar-se-á o estado da arte da cadeia produtiva do coco, enfocando a atual problemática do resíduo oriundo do consumo de coco verde.

### 2.1 ENZIMAS: UMA BREVE INTRODUÇÃO

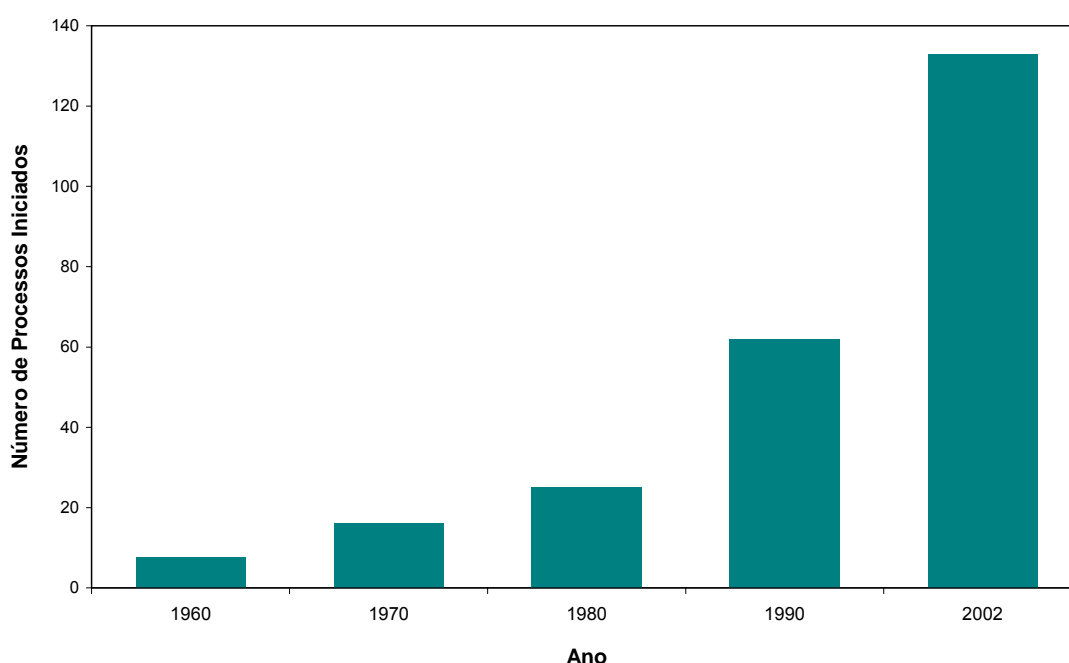
Enzimas são, exceto um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas, um tipo especial de proteínas – cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas – produzidas dentro das células dos organismos vivos que apresentam atividade catalítica. Elas são os agentes principais nas transformações celulares, já que funcionam como catalisadores, facilitando reações bioquímicas através da redução da energia de ativação sem se deixarem consumir ou mesmo alterar a constante de equilíbrio ou a energia livre da reação (LEHNINGER, 1970; BAILEY e OLLIS, 1986).

O estudo das ações de enzimas em reações do metabolismo levou à identificação e purificação de milhares delas, à elucidação de sua estrutura molecular e do seu mecanismo químico de ação e a uma compreensão geral de como elas funcionam (LEHNINGER, 1970). Tal “descoberta” promoveu a identificação de potenciais aplicações tecnológicas, dentre as quais se destacaram as realizadas na indústria de alimentos e bebidas, sendo estas praticadas há mais de cinquenta anos, beneficiando tanto o processamento como a qualidade dos produtos (FABER, 1997; LEHNINGER, 1970).



### 2.1.1 Aplicações Industriais das Enzimas como Biocatalisadores

O surgimento de novas tecnologias de desenvolvimento e seleção de biocatalisadores tem proporcionado a obtenção de enzimas mais específicas e mais compatíveis com solventes orgânicos e altas temperaturas. Esta evolução levou a um crescente aumento no número de bioprocessos implantados em escala industrial nas últimas décadas (Figura 2.1), sendo o setor de fármacos responsável por mais de 50% destes bioprocessos atualmente em operação (STRAATHOF, PANKE e SCHMID, 2002).



**Figura 2.1:** Evolução do número de processos biocatalisados, em escala industrial, ao longo das últimas décadas (STRAATHOF, PANKE e SCHMID, 2002).

Dentre os agentes que impulsionaram este crescimento no número de bioprocessos, tem-se a busca por tecnologias limpas – reflexo do aumento da preocupação com as questões ambientais, com a qualidade do produto e com a redução dos gastos em setores industriais. Visando processos limpos, em consonância com as ISO Série 14.000<sup>1</sup> e com as ISO Série 9.000<sup>2</sup>, a tecnologia

<sup>1</sup> ISO Série 14.000 são conjuntos de normas e diretrizes que pretendem estabelecer padrões para sistemas de gerenciamento, auditoria e rotulagem ambiental, avaliação de ciclo de vida de produtos e aspectos ambientais em normas de produtos (BRILHANTE e CALDAS, 1999).

<sup>2</sup> ISO Série 9.000 são conjuntos de normas e diretrizes que formam um modelo de gestão da qualidade para organizações que podem, se desejarem, certificar seus sistemas de gestão através de organismos de certificação (WIKIPÉDIA, 2006).

---

enzimática surgiu como uma alternativa para a substituição gradual de processos químicos (BON e PEREIRA JUNIOR, 1999). Devido à elevada especificidade de algumas enzimas, as reações secundárias são mínimas ou inexistentes, evitando assim a formação de subprodutos indesejáveis, o que tornam os processos biocatalisados mais limpos e com menor percentual de impacto ambiental. Em decorrência das características dos processos biocatalisados, a tecnologia enzimática destaca-se como uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento da química verde, que se dedica à criação, ao desenvolvimento e à aplicação de produtos e processos químicos com o intuito de reduzir ou eliminar o uso e/ou a geração de substâncias tóxicas (PRADO, 2003; SILVA, LACERDA e JONES JUNIOR, 2005).

A aplicação de enzimas como biocatalisadores em processos industriais tem se dado em indústrias alimentícia, têxtil, de papel e celulose, detergentes, óleos e gorduras, dentre outras. Além disso, cresce o número de bioprocessos utilizados na obtenção de enantiômeros, síntese de intermediários de fármacos, herbicidas e substâncias químicas finas, como aminoácidos (HASAN, SHAH e HAMEED, 2005; ZAKS, 2001; STRAATHOF, PANKE e SCHMID, 2002; ROBERTSON e STEER, 2004). Tais sistemas de produção biocatalisados são responsáveis por 52% do mercado mundial de enzimas industriais, o qual, em 2004, foi estimado em 2 bilhões de dólares (RAJAN, 2005).

Fazendo um paralelo entre catalisadores químicos e biológicos (Tabela 2.1), a principal vantagem das enzimas é a capacidade que estas possuem de catalisar reações sob condições suaves de temperatura e pressão, além disso, possuem alto grau de especificidade por seus substratos. Tais características têm como benefício a redução do consumo energético, a redução dos riscos de desnaturação térmica de compostos termolábeis e menor formação de subprodutos (LEHNINGER, 1970). Porém, apesar de tais vantagens e do grande potencial de aplicação, muitos processos ainda não são viáveis devido a questões como os custos de obtenção das enzimas e a sensibilidade de algumas a altas temperaturas. Para superar tais entraves, a tecnologia de genes recombinantes bem como a imobilização de enzimas têm sido utilizada. A primeira abre espaço para o crescimento da engenharia de proteínas através da qual tem sido possível fornecer enzimas adequadas a expor novas atividades e adaptadas a novas condições de processo,

possibilitando uma expansão futura ao seu uso industrial (KIRK, BORCHERT e FUGLSANG, 2002). A segunda, apresenta-se como uma forma de otimizar e baratear processos enzimáticos. A partir de enzimas imobilizadas é possível não só a implantação de processos contínuos como também a recuperação do catalisador por métodos simples de separação, possibilitando o reuso. Além da mudança direta no processo, o uso de técnicas de imobilização de enzimas pode proporcionar a obtenção de catalisadores operacional e termicamente mais estáveis (AL-DURI e YONG, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2004; BLANCO *et al.*, 2004) e mais seletivos (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2001; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2003).

**Tabela 2.1:** Comparação entre catalisadores químicos e catalisadores biológicos (ZANIN, 1989).

<b>Característica</b>	<b>Catalisadores Químicos</b>	<b>Catalisadores Biológicos</b>
Especificidade ao substrato	Baixa	Alta
Natureza da estrutura	Simples	Complexa
Sensibilidade à temperatura e pH	Baixa	Alta
Condições de reação (T, P e pH)	Drásticas (em geral)	Suaves
Custo de obtenção (isolamento e purificação)	Moderado	Alto
Natureza do processo	Contínuo	Batelada
Consumo de energia	Alto	Baixo
Formação de subprodutos	Alta	Baixa
Separação catalisador/produto	Simples	Difícil / Cara
Atividade catalítica (temperatura ambiente)	Baixa	Alta
Presença de cofatores	Não	Sim
Estabilidade do derivado	Alta	Baixa
Energia de ativação	Alta	Baixa
Velocidade de reação	Baixa	Alta

### 2.1.2 Enzimas Imobilizadas

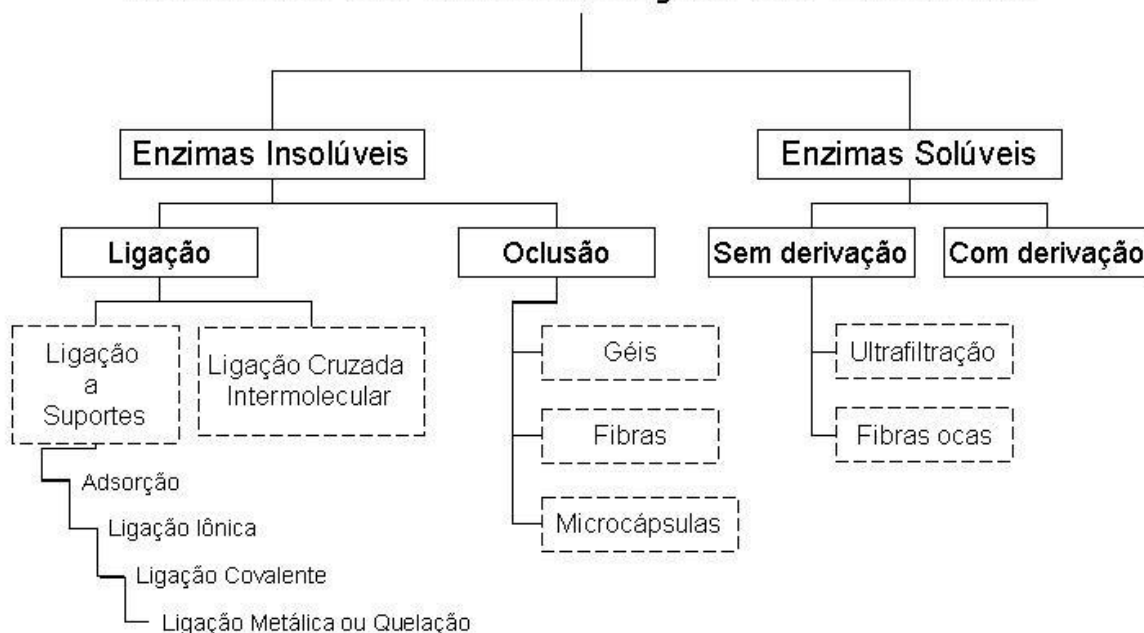
Segundo Van Beynum (1980), enzimas imobilizadas são aquelas que se encontram confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de sua capacidade catalítica, e que podem ser utilizadas repetida e continuamente. Elas podem ser aplicadas tanto em catálise heterogênea como também em métodos analíticos ou como adsorventes seletivos de proteína, como micro-dispositivo para recuperação controlada de proteínas entorpecentes ou mesmo como ferramenta fundamental na química de proteínas na fase sólida (CAO, 2005). Todavia, a maior aplicação se dá na catálise heterogênea, sendo hoje, devido aos avanços da tecnologia de imobilização, equivalente o número de processos que fazem uso tanto de enzimas livres quanto de enzimas imobilizadas (STRAATHOF, PANKE e SCHMID, 2002).

Processos economicamente importantes, tais como a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, D-aminoácidos, dextrana, açúcar invertido e glicose, e hidrólise de caseína, são exemplos da aplicação industrial de enzimas imobilizadas (BAILEY e OLLIS, 1986; EGOROV *et al.*, 2000; D'SOUZA, 2006). Seu intenso uso na indústria farmacêutica e de certos produtos alimentícios se dá, principalmente, por esta técnica proporcionar um alto grau de pureza ao produto obtido. Outro benefício desta tecnologia é a possibilidade do desenvolvimento de processos contínuos, aumentando a produtividade e reduzindo os custos de produção (D'SOUZA, 2006). Frente ao aumento da estabilidade promovido à enzima pela imobilização, outra aplicação que tem sido amplamente estudada é seu uso em reações promovidas em meios não convencionais, como solventes orgânicos, sistemas bifásicos, fluidos supercríticos e meios sólidos (VERMUË e TRAMPER, 1995; GUPTA e ROY, 2004).

Uma forma de classificar as enzimas imobilizadas é (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988): (a) enzimas modificadas a forma insolúvel em água por técnicas convenientes, (b) enzimas solúveis usadas em reatores equipados com membranas de ultrafiltração não permanente que retem as enzimas dentro do reator e (c) enzimas com mobilidade restrita por ligação à outra macromolécula. A forma como elas estarão imobilizadas depende da técnica a ser aplicada (Figura 2.2), a qual deverá ser selecionada de acordo com as propriedades bioquímicas das enzimas,

as propriedades químicas e físicas do suporte e com os objetivos de uso deste derivado.

## Métodos de Imobilização de Enzimas



**Figura 2.2:** Classificação dos principais métodos de imobilização de enzimas (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988).

### 2.1.2.1 Imobilização por adsorção

A imobilização de enzimas por adsorção ocorre quando uma enzima se liga a um suporte sólido através de interações iônicas, adsorção física, ligações hidrofóbicas e forças atrativas de Van der Waals ou mesmo por uma combinação destas interações. Esta técnica, embora seja simples e de baixo custo, possui como desvantagem a baixa energia de ligação entre a enzima e o suporte, sendo observada a dessorção das enzimas quando submetidas a variações de temperatura, pH, força iônica ou mesmo na presença do substrato. Contudo, apesar das enzimas imobilizadas estarem suscetíveis a dessorção, a imobilização por adsorção é uma das técnicas mais empregadas na obtenção de biocatalisadores insolúveis (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988; BAILEY e OLLIS, 1986). A maior aplicação destes biocatalisadores se dá em meios orgânicos, onde as enzimas não são solúveis, desfavorecendo a dessorção (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998).

Para que a imobilização por adsorção ocorra, faz-se necessário um tempo de contato entre a enzima e o suporte, sob condições apropriadas. Estas dependerão

---

diretamente da enzima e do suporte a ser estudado. Assim, o estudo de variáveis como pH da solução de enzima, natureza do solvente, força iônica, concentração de enzima, proporção enzima:adsorvente e temperatura de imobilização deve ser realizado para cada sistema enzima-suporte empregado (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988).

Estudos de cinética e equilíbrio têm possibilitado a comparação de aplicação de diferentes suportes para imobilização de enzimas (NASCIMENTO, COSTA NETO e MAZZUCO, 2001; BRUNO *et al.*, 2004; HORNBY e GOLDSTEIN, 1976; SROKA, 1994; YESILOGLU, 2005), bem como a avaliação do uso de aditivos ou solventes durante o processo (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998). Este estudo é realizado à temperatura constante e as isotermas de adsorção que são obtidas seguem, em geral, as equações de Langmuir ou Freundlich (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

No processo de imobilização por adsorção, tanto a quantidade de enzimas adsorvidas quanto a orientação em que estas são imobilizadas afetam sua atividade e estabilidade (NAKANISHI, SAKIYAMA e IMAMURA, 2001). Logo, além de avaliar a quantidade adsorvida, é necessário determinar os valores de atividade recuperada (atividade retida no suporte frente à diferença na atividade do sobrenadante antes e após a imobilização) e rendimento (diferença na atividade do sobrenadante antes e após a imobilização frente à atividade oferecida para a imobilização) obtidos para um dado processo de imobilização (GITLESEN, BAUER e ADLERCREUTZ, 1997).

#### 2.1.2.2 Imobilização por ligação covalente

A imobilização por ligação covalente se baseia na retenção da enzima à superfícies do suporte através de ligações covalentes entre grupos funcionais presentes na enzima e na superfície da matriz. Os grupos funcionais das enzimas, disponíveis para ligações com o suporte são: grupos aminas; grupos carboxílicos; grupo fenólico da tirosina; grupo sulfidrílico da cisteína; grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina; grupo imidazol da histidina; grupo indol do triptofano. Tais grupos irão reagir com grupos reativos (por exemplo, diazônio, isocianetos, haletos e azidas) disponíveis em alguns suportes ou mais comumente com grupos previamente ativados como grupos hidroxílicos, grupos carboxílicos e grupos aminas. Dentre os agentes funcionalizantes mais utilizados na ativação do grupo

---

ligante, tem-se: brometo de cianogênio, cloroformiato de etila, carbodiimida, 3-aminopropiltriétoxissilano ( $\gamma$ -APTS) e glutaraldeído (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988; BAILEY e OLLIS, 1986; ZANIN, 1989).

Como desvantagem deste método, tem-se uma maior dificuldade na seleção das condições de imobilização, o que demanda maiores estudos no desenvolvimento de um protocolo. Além disso, o uso de agentes funcionalizantes na etapa de ativação do suporte promove um maior custo na obtenção do biocatalisador insolúvel (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988; ZANIN, 1989). Porém, a ligação formada entre a enzima e o suporte pela técnica de ligação covalente é forte, o que torna o derivado obtido mais estável frente à técnica de adsorção. Além disso, através deste método, em geral, obtêm-se alta atividade catalítica no derivado (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988; ZANIN, 1989). Mas, para que isto ocorra, é fundamental que as ligações se dêem apenas entre os grupos não essenciais para a atividade da enzima. Uma forma de evitar ligações dos grupos funcionais do sítio catalítico é o uso de substratos ou inibidores competitivos durante o processo de imobilização (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988; MATEO *et al.*, 2000; OTERO, BALLESTEROS e GUIÁN, 1988).

Frente a dificuldade na seleção das condições de imobilização e impulsionados pela alta estabilidade fornecida aos derivados, muitos estudos têm sido realizados fazendo uso desta técnica de imobilização. Uma variável que tem sido estudada, no caso específico de ligações covalentes de grupos amins, é a imobilização em valores básicos de pH, com o objetivo de se estabelecer várias ligações entre uma molécula de enzima e vários grupos ativos no suporte (ligações multipontuais), obtendo-se, conseqüentemente, um derivado térmica e operacionalmente mais estável (OTERO, BALLESTEROS e GUIÁN, 1988; STARK e HOLMBERG, 1989; PALOMO *et al.*, 2003a; ADRIANO, 2004).

A atividade, estabilidade e especificidade da enzima imobilizada por ligações multipontuais dependem: da origem da enzima; do suporte; do método de ativação; do número de ligações covalente enzima-suporte; do tempo e da temperatura de imobilização; do pH e da presença de inibidores e/ou de substratos no meio reacional (PEREIRA, 1996). Objetivando uma multiteração enzima-suporte, os grupos amina terminais ou grupos lisina residuais são os grupos reativos presentes na enzima mais adequados, dada sua reatividade. Quanto ao método de ativação do

---

suporte, este deve produzir grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico (PEREIRA, 1996). Segundo Fernández-Lafuente *et al.* (1999), a escolha de um adequado sistema de imobilização/estabilização e um rigoroso controle de intensidade do processo de multiteração enzima-suporte atendem às necessidades de aperfeiçoamento da estabilidade operacional das enzimas industriais.

### 2.1.2.3 Outras técnicas de imobilização

Outra técnica utilizada para imobilização de enzimas através da ligação desta ao suporte é a ligação com metal, ou quelatação. Esta faz uso de um metal de transição para ativar a superfície do suporte permitindo o acoplamento direto da enzima. Devido à simplicidade da técnica e relativa estabilidade do derivado obtido, alguns estudos de imobilização visando a obtenção de biocatalisadores insolúveis foram realizados, destacando-se a celulose como suporte empregado (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988; GONÇALVES, 1996).

A imobilização via inclusão ou microencapsulamento consiste em “confinar” a enzima em um polímero insolúvel (envolvimento em fibra ou gel) ou em uma microcápsula (microencapsulamento). Desta forma, moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, difundem-se. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana, bem como o peso molecular dos mesmos, são fatores limitantes (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; KENNEDY, WHITE e MELO, 1988; GONÇALVES, 1996).

A imobilização por confinamento físico em ultra-membranas e fibras ocas tem se expandido consideravelmente nos últimos anos. Dentre algumas aplicações industriais existentes, podem ser citadas: produção de anti-inflamatórios e esteróides; remoção de nitrogênio de águas residuárias; produção de leite deslactosado; hidrólise de pectinas no processo de clarificação de sucos e remoção de compostos polifenólicos do suco de uva na fabricação de vinho (GIORNO e DRIOLI, 2000). Como exemplo de vantagens deste método, pode-se citar a imobilização simultânea de diferentes enzimas e o alto controle da seletividade de



substrato e produtos através de membranas seletivas. Contudo, a dificuldade de trabalho com baixas concentrações de substrato, devido à adsorção do substrato na membrana, e a possível redução da velocidade de reação, devido à resistência à permeabilidade da membrana, são alguns fatores que limitam sua implantação (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988).

Além de enzimas imobilizadas em suportes, estudos têm sido realizados objetivando a obtenção de enzimas imobilizadas livres de suporte. Tais derivados são obtidos através de ligação cruzada direta em diferentes preparações como enzima dissolvida, enzima cristalizada, enzima liofilizada e enzimas fisicamente agregadas. A retenção da atividade e a estabilidade das enzimas assim imobilizadas dependem de alguns fatores, tais como o meio no qual a ligação foi realizada e os agentes ligante e precipitante utilizados. Algumas aplicações industriais têm se restringido ao uso de ligações cruzadas entre enzimas cristalizadas e enzimas fisicamente agregadas, em específico para lipases, proteases e acilases (CAO, 2005; CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003).

#### 2.1.2.4 Suportes para imobilização de enzimas

Vários materiais podem ser usados como suporte de imobilização e, durante uma seleção para um dado processo de imobilização, as principais propriedades que devem ser analisadas são: pH, carga, natureza hidrofóbica e hidrofílica, e presença de íons metálicos na superfície; morfologia; composição; resistência ao ataque microbiológico; resistência mecânica, e resistência à compactação em operações a altas vazões quando se utiliza reatores de leito fixo (ZANIN, 1989). Mas, a escolha do suporte para a imobilização depende não só das suas propriedades químicas e físicas, como também, e principalmente, da enzima a ser imobilizada e do processo no qual o catalisador será aplicado. Logo, pode-se dizer que não há um suporte universal que possa ser aplicado em todas as situações (ZANIN, 1989; D´SOUZA, 2006).

Os materiais utilizados como suporte podem ser porosos, não porosos ou estrutura de gel. A vantagem do uso de materiais porosos é a existência de uma grande área interna disponível para a imobilização, protegendo a enzima da turbulência externa. Em contraponto, a vantagem dos materiais não porosos, apesar da baixa área superficial, é a ausência da resistência à transferência de massa

---

interna, que em alguns casos pode tornar a velocidade da reação bastante lenta. Quanto aos géis, estes são utilizados nos casos em que a grade formada seja de malha suficiente para reter a proteína sem implicar em restrições difusionais para o substrato (GONÇALVES, 1996; ZANIN, 1989).

Outra forma de classificar os materiais utilizados como suporte é quanto a sua composição, sendo estes divididos entre suportes orgânicos e suportes inorgânicos. Os suportes orgânicos podem ser naturais (celulose, agar, quitina, amido, colágeno etc) ou sintéticos (polistireno, poliacrilatos, polivinílicos, nylon etc). Os inorgânicos, por sua vez, dividem-se em minerais (areia, bentonita, argilas, “horneblenda”, “pedra-pomes” etc) e fabricados (vidro, cerâmica e sílica de porosidade controlada, óxido de ferro, óxido de níquel etc) (GONÇALVES, 1996; ZANIN, 1989).

Características como elevada força mecânica, resistência a solventes orgânicos, estabilidade frente a variações de pressão, temperatura e pH, e fácil regeneração por processo de pirólise tornam os suportes inorgânicos mais adequados para o uso industrial. Contudo, fatores como alto custo deste tipo de suporte (CASTRO, SILVA e SILVA, 2000) e grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser adicionados e/ou ativados em suportes orgânicos (HEINZE e LIEBERT, 2001) contribuem para que a maioria das enzimas imobilizadas, disponíveis comercialmente, sejam obtidas com matrizes orgânicas (PEREIRA, 1996).

Apesar dos suportes orgânicos terem um custo menor, é fato que, atualmente, um dos maiores entraves de realizar o aumento de escala de certos bioprocessos é o custo da enzima imobilizada. No caso de imobilização em polisiloxano-álcool polivinílico, por exemplo, tem-se que apenas, aproximadamente, de 15,4 a 36,7% do custo do derivado (considerando, respectivamente, lipase pancreática e lipase de *Candida rugosa* como as enzimas imobilizadas) são decorrentes do biocatalisador utilizado. Os principais custos representam o suporte, os aditivos e o agente funcionalizante utilizado (URIESTE, 2004). Neste contexto, pesquisas têm sido desenvolvidas na busca por processos de imobilização mais baratos, sendo o suporte um dos grandes alvos desta busca pela redução de custos.

A busca por suportes mais baratos e a abundância de resíduos agroindustriais, tem levado a alguns estudos de imobilização de enzimas em resíduos agroindustriais. D’Souza e Godbole (2002), por exemplo, estudaram a

---

imobilização de invertase em casca de arroz, através da funcionalização com polietilenamina. O derivado obtido mostrou-se bastante estável operacionalmente, tendo-se observado que após 12 ciclos reacionais ele não perdeu atividade. Em paralelo, Castro, Lima e Roberto (2001) avaliaram o desempenho de palha de arroz como suporte para imobilização de lipase. O material foi funcionalizado com glutaraldeído. Os resultados foram similares aos encontrados para a imobilização de lipase em quitosana ou polímeros sintéticos. Outro resíduo agroindustrial estudado foram sementes processadas, oriundas de cervejarias, nas quais Rocha *et al.* (2005) imobilizaram tripsina por adsorção ou tratando o suporte com glutaraldeído ou com dietilaminoetil. A enzima imobilizada em suporte tratado com glutaraldeído mostrou-se mais estável frente às outras duas, mantendo cerca de 81% de sua atividade após 3 ciclos reacionais. Além disso, outros resíduos agroindustriais, que foram estudados como suporte para biossorção de metais pesados ou para imobilização de microrganismos, possuem um potencial a ser estudado quanto ao uso como matriz para a imobilização de enzimas. Como exemplo destes materiais, pode-se citar: fibra de juta (SHUKLA e PAI, 2005), bagaço de cana-de-açúcar, casca de amendoim (RAMÍREZ-LÓPEZ *et al.*, 2003), casca de arroz (CASTRO, LIMA e ROBERTO, 2001) e pó de coco (PINO, 2005).

No que se refere ao suporte estudado neste trabalho, até o momento, apenas um trabalho foi reportado fazendo uso de fibra de coco como suporte para enzimas. Dey, Nagpal e Banerjee (2002) estudaram a imobilização de  $\alpha$ -amilase de *Bacillus circulans* GRS 313 em fibra de coco maduro. A enzima foi imobilizada por adsorção e um planejamento fatorial foi realizado a fim de se avaliar as melhores condições de imobilização. As condições de imobilização ótimas foram temperatura de adsorção igual a 30°C, pH 5,5 e proporção de 1 mL de solução de enzima/1 g de fibra. O derivado manteve 90% do seu potencial catalítico após 3 ciclos e teve bom rendimento.

#### 2.1.2.5 Estabilidade das enzimas imobilizadas

A viabilidade de aplicação industrial de catalisadores está diretamente ligada a dois fatores principais: potencial catalítico frente à reação em estudo e estabilidade a variáveis de processos como pH e temperatura. Os estudos de imobilização de enzimas têm como força motriz a busca por biocatalisadores mais estáveis,

possibilitando, assim, seu reuso e sua implementação em processos contínuos (ILLANES, 1999). Desta forma, é fundamental avaliar a estabilidade dos derivados obtidos durante estudos de imobilização, principalmente a térmica e operacional.

A estabilidade térmica é a capacidade que a enzima solúvel ou imobilizada possui de manter seu potencial catalítico quando submetida a uma dada temperatura por um tempo definido. A imobilização tende a aumentar a estabilidade térmica da enzima, porém, tal estabilidade depende do método de imobilização utilizado, do suporte e da solução de incubação em estudo (água, solução tampão ou na presença de substrato) (ARROYO, SANCHEZ-MONTERO e SINISTERRA, 1999; ZANIN, 1989).

Quanto à estabilidade operacional de uma enzima imobilizada, esta é a capacidade que a enzima possui de manter seu potencial catalítico quando submetida a vários ciclos reacionais. Dentre os fatores que contribuem para a queda do potencial catalítico durante os consecutivos ciclos destaca-se: desprendimento da enzima do suporte; desativação da enzima pelo substrato; obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; perda de suporte por atrito ou dissolução; obstrução do leito fixo causando canais preferenciais; crescimento de microrganismo (ILLANES, 1999; ZANIN, 1989).

Outro parâmetro de estabilidade que deve ser avaliado para os biocatalisadores é a estabilidade à estocagem. O biocatalisador, quando estocado em condições favoráveis de pH e temperatura, tendem a manter seu potencial catalítico. Embora, geralmente, enzimas imobilizadas tenham uma maior estabilidade à estocagem frente à enzima em solução, esta estabilidade depende do método de imobilização, do suporte e da solução de estoque usada (ZANIN, 1989).

### **2.1.3 Cinética de Reações Biocatalisadas**

As enzimas, quando catalisam uma dada reação, possuem distintos mecanismos de ação sobre seus substratos específicos. Múltiplas abordagens são comumente empregadas para estudar estes mecanismos de ação. O conhecimento da estrutura tridimensional da proteína fornece informações importantes, como o papel individual dos aminoácidos na sua ação catalítica. Contudo, a abordagem mais antiga e central para a compreensão dos mecanismos enzimáticos é determinar a velocidade da reação e a influência de parâmetros experimentais,

como concentração de substrato, temperatura e pH. É o que se denomina de estudo cinético da reação (LEHNINGER, 1970).

As reações biocatalisadas podem ser homogêneas, quando enzima e o substrato se encontram na mesma fase – ou heterogênea – quando há presença de duas ou mais fases. Tal característica do sistema é de fundamental importância durante o estudo da cinética de reação, haja vista que na catálise heterogênea fenômenos de transporte e de partição influenciam diretamente na velocidade global de reação (FOGLER, 2002).

A forma mais simples de estudar a velocidade de uma dada reação catalisada por enzimas é considerar que a mesma segue o mecanismo de Michaelis-Menten (Equação 2.1). Para que a representação da Equação 2.1 seja válida, admiti-se trabalhar a altas concentrações de substrato, de forma que todos os sítios ativos das enzimas podem estar ocupados com substratos. Desta forma a concentração do complexo ES permanece constante e a reação reversa de dissociação é praticamente nula.



sendo:

- E            enzima utilizada como catalisador;
- S            substrato da reação;
- ES          complexo enzima-substrato formado no estado intermediário;
- P            produto obtido através da reação catalisada;
- $k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$     constantes reacionais.

Porem, o mecanismo postulado por Michaelis e Menten é válido, geralmente, para reações enzimáticas simples. Interações mais complicadas entre a enzima e o substrato, como em reações de múltiplos substratos e/ou enzimas não podem ser representadas pelo mecanismo de Michaelis-Menten, sendo necessário o uso de outros modelos cinéticos (PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000).

#### 2.1.3.1 – Fatores que influenciam a velocidade de uma reação biocatalisada

Os principais fatores que influenciam a velocidade de uma reação biocatalisada em sistema homogêneo são: concentração de enzima, pH do meio reacional, concentração de substrato e temperatura de reação.

## a) Concentração de enzima:

Geralmente a velocidade de reações enzimáticas é diretamente proporcional à concentração de enzimas presentes. Contudo, a presença de inibidores na própria solução de enzima ou a presença de substâncias tóxicas ou de um ativador pode promover desvios da linearidade. Limitações no método de análise também podem afetar o comportamento linear da velocidade de reação frente à concentração de enzima (ZANIN, 1989).

## b) pH do meio reacional:

Sabendo-se que enzimas são proteínas, mudanças de pH provocam alterações no caráter iônico dos grupos aminos e dos grupos carboxílicos da proteína, afetando o sítio catalítico e a conformação de uma enzima. Tais mudanças conformacionais influenciam na interação enzima-substrato afetando a taxa de reação máxima,  $K_m$  e a estabilidade da enzima. Além dos efeitos puramente iônicos, baixos ou altos valores de pH podem causar desnaturação considerável e conseqüentemente inativação da proteína enzimática. Assim, cada enzima possui uma faixa de pH ótimo, onde a velocidade de reação é máxima (CONN e STUMPF, 1980; BAILEY e OLLIS, 1986).

## c) Concentração de substrato:

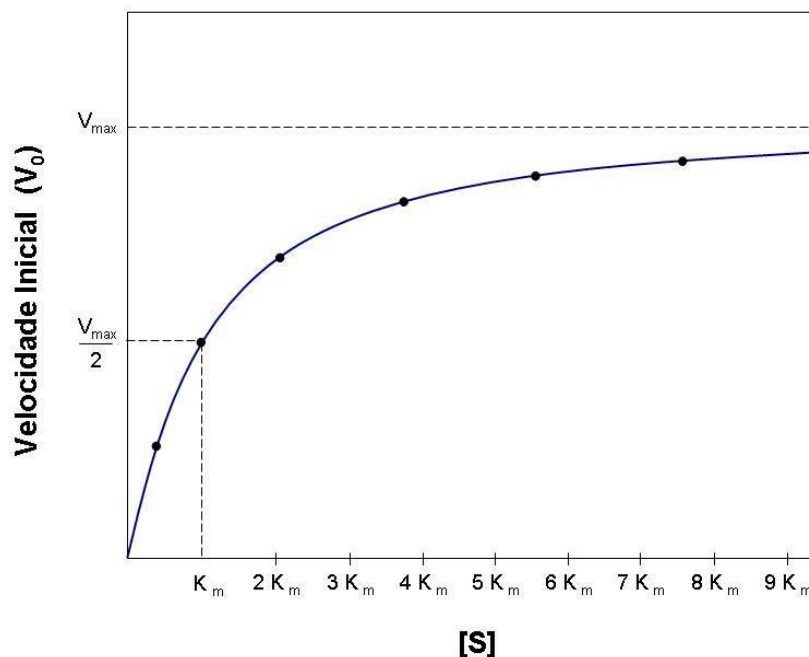
Detendo-se apenas a uma reação simples e considerando que a mesma obedece ao modelo de Michaelis–Menten, observa-se que, para baixas concentrações de substrato, a maior parte da enzima está na forma livre. Nessas condições, a velocidade da reação será proporcional à concentração de substrato porque o equilíbrio da etapa de formação do complexo enzima-substrato é deslocado na direção da formação do complexo enzima-substrato à medida que a concentração de substrato aumenta. Contudo, conforme pode ser visto na Figura 2.3, quando praticamente todas as moléculas de enzimas estão com seus sítios ativos ocupados, em altas concentrações de substratos, alcançar-se-á a velocidade inicial máxima da reação (SHULER e KARGI, 1992).

A expressão matemática que modela o comportamento observado na figura 2.3 é a equação de Michaelis–Menten (Equação 2.2):

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad (2.2)$$

sendo  $K_m$  a constante de Michaelis expressa em unidades de concentração (moles/litro) e  $V_{\max}$  a velocidade máxima na concentração de saturação do substrato. A constante  $K_m$  é dada pela Equação 2.3.

$$K_m = \frac{k_3 + k_2}{k_1} \quad (2.3)$$



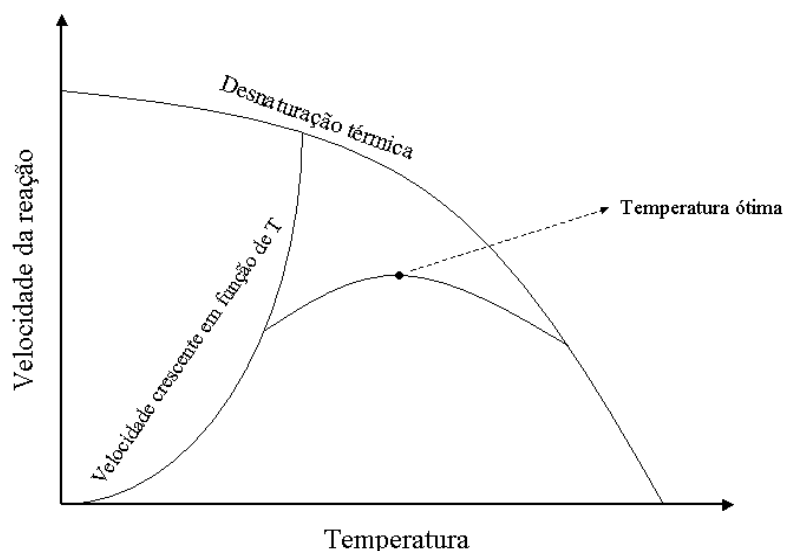
**Figura 2.3:** Influência da concentração de substrato na velocidade inicial de reação catalisada por enzimas

d) Temperatura de reação:

Uma reação catalisada por enzima, diferentemente de uma reação não-catalisada, possui duplo efeito na relação temperatura-reação. Até uma dada faixa de temperatura, o efeito predominante será o aumento da velocidade da reação, como prevê a teoria da cinética química representada através da equação de Arrhenius (Equação 2.4). A partir de um determinado ponto, um fator oposto, a desnaturação térmica, tornar-se-á cada vez mais importante, até que, acima de um certo limite, a rápida desnaturação destruirá a função catalítica da enzima (CONN e STUMPF, 1980).

$$\log K = \log A - \frac{E_A}{2,3.RT} \quad (2.4)$$

As faixas de temperatura onde ocorrerão tais fenômenos dependem do tipo de enzima. Além disso, considerando a Figura 2.4, o ponto no pico da curva é a temperatura ótima na qual aquela enzima deve catalisar uma reação.



**Figura 2.4:** Influência da temperatura na velocidade de reações catalisadas por enzimas

## 2.2 LIPASES: BIOCATALISADORES INDUSTRIAIS EM POTENCIAL

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores de maior representatividade comercial haja vista a ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de reação e ampla especificidade para substratos (FABER, 1997; STRAATHOF, PANKE e SCHMID, 2002). Dentre as diversas enzimas hidrolíticas, como exemplo, amilases, celulasas, poligalacturonase, polipeptidases etc, destacam-se as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3), as quais catalisam a hidrólise e síntese de ésteres formados por glicerol e longas cadeias de ácidos graxos (JAEGER e REETZ, 1998), constituindo uma subclasse de esterases (BAILEY e OLLIS, 1986; MARTINELLE, HOLMQUIST e HULT, 1995).

Algumas lipases são encontradas em plantas, por exemplo, a espécie *Vernonia galamensis* (NCUBE e READ, 1995), outras no pâncreas suíno e muitas são produzidas por microrganismos (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa* etc). Segundo Dumitriu *et al.* (2003), mais de 50 lipases foram identificadas, purificadas e caracterizadas. Contudo, a principal fonte de obtenção para o uso comercial é a partir de microrganismos por meio de



---

fermentação submersa ou semi-sólida, tendo sido observado a obtenção de enzimas mais resistentes e estáveis por fermentação semi-sólida (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

As lipases possuem características específicas que estão diretamente relacionadas à fonte de obtenção. Em alguns casos, lipases de uma mesma fonte pode apresentar características diferentes, como é o caso das lipases obtidas por fermentação utilizando *Candida antarctica* (MARTINELLE, HOLMQUIST e HULT, 1995). De acordo com a origem, estas enzimas podem ter massa molar variando entre 19 a 75 kDa, atividade em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C e pH, na faixa de 4 a 9. Outra propriedade importante, o ponto isoelétrico, pode variar entre 3,6 e 7,6, sendo majoritariamente ácido (JAEGER e REETZ, 1998; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; CASTRO *et al.*, 2004).

### **2.2.1 Estrutura e Mecanismo de Atuação das Lipases**

A investigação por raios-X das estruturas enzimáticas tem mostrado que todas as lipases são membros de uma família de entrelaçado  $\alpha/\beta$  hidrolase (PLEISS, FISCHER e SCHMID, 1998). O núcleo da lipase é composto de uma folha  $\beta$  central consistindo de 8 diferentes fitas  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 8) conectadas com seis  $\alpha$  hélices (A-F). O sítio ativo é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina; o resíduo nucleofílico serina é localizado no C-terminal da fita  $\beta$ 5 de um pentapeptídeo GX SXG altamente conservado, formando uma característica principal “ $\beta$  em torno de  $\alpha$ ”, designada como a cavidade nucleofílica (JAEGER e REETZ, 1998).

Outro aspecto estrutural comum às lipases é a presença de uma tampa ou válvula, composta de uma ou duas seqüências peptídicas em  $\alpha$  hélice, que cobre o sítio ativo (PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000; PLEISS, FISCHER e SCHMID, 1998). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo acessível ao substrato. Ao mesmo tempo em que o centro ativo fica acessível, uma larga superfície hidrofóbica é exposta, facilitando a ligação da lipase à interface (JAEGER e REETZ, 1998; PLEISS, FISCHER e SCHMID, 1998). A interação da área que rodeia o sítio ativo com superfícies hidrofóbicas, modificando propriedades funcionais da lipase, chama-se ativação interfacial. Este fenômeno relaciona o

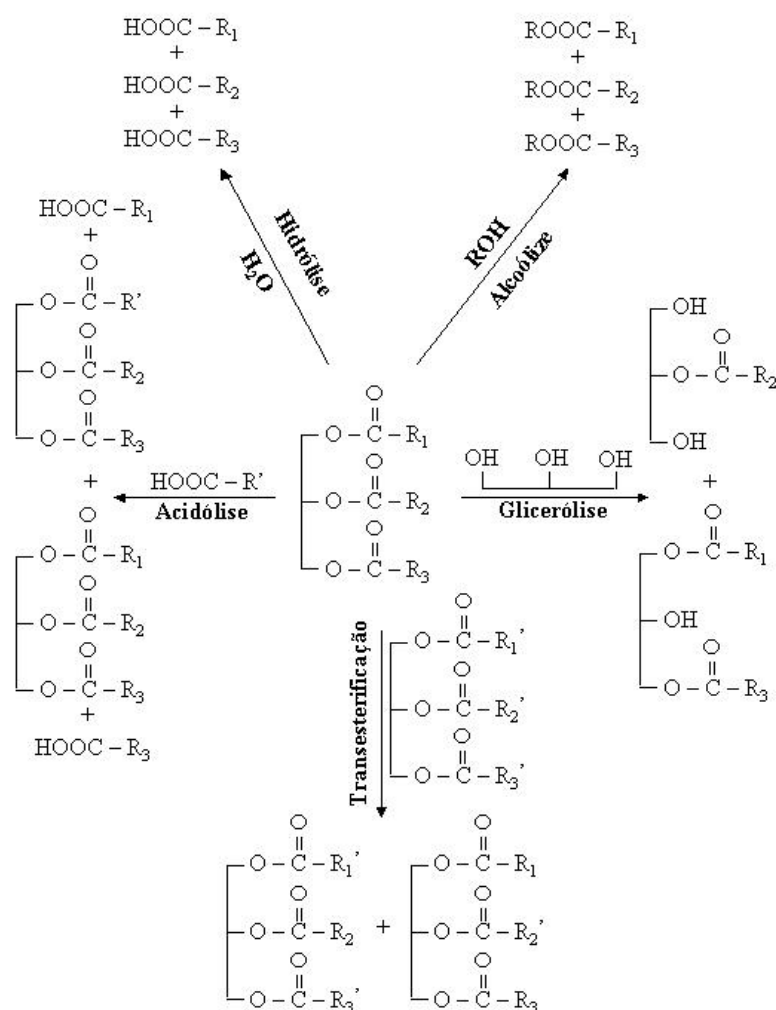
---

aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis que formam emulsão, sendo observado em algumas reações lipolíticas uma cinética não descrita pelo modelo de Michaelis-Menten. Contudo, a presença da tampa não implica dizer que necessariamente será observado o fenômeno de ativação interfacial. Recentemente, algumas lipases (oriundas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e a tipo B de *Candida antarctica*), que apresentam tampa em suas estruturas, mostraram não sofrer o fenômeno de ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998).

Quanto ao mecanismo de atuação da hidrólise de ésteres de uma  $\alpha/\beta$  hidrolase, este se inicia com um ataque nucleofílico ao átomo carboxílico da ligação éster pelo oxigênio da serina do sítio catalítico. Posteriormente, há a formação de um intermediário tetraédrico, o qual é estabilizado pelas ligações de hidrogênio a átomos de nitrogênio de resíduos da cadeia principal pertencente à cavidade de oxianion (JAEGER e REETZ, 1998) – uma região eletrofílica em torno do resíduo de serina criada pela reestruturação conformacional da lipase (PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000). Após a formação do complexo acil-lipase, um álcool é liberado. Finalmente, o complexo acil-lipase é hidrolisado, liberando ácidos graxos e regenerando a enzima (JAEGER e REETZ, 1998).

### **2.2.2 Aplicações das Lipases como Biocatalisadores**

A função metabólica das lipases é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (COSTA e AMORIM, 1999). Contudo, sob condições microaquosas, elas são capazes de catalisar a síntese de éster a partir de um álcool e ácido carboxílico. Uma combinação destes dois processos básicos em seqüências lógicas pode resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise ou transesterificação, a depender dos reagentes de partida), ver Figura 2.5 (CASTRO *et al.*, 2004). Além disso, elas também são capazes de catalisar aminólise e tiotransesterificação (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).



**Figura 2.5:** Reações catalisadas por lipases (CASTRO *et al.*, 2004)

Diante da versatilidade das lipases frente às reações por elas catalisadas, a aplicação industrial destas enzimas estende-se tanto ao setor alimentício – produção de laticínios, óleos, bebidas etc – quanto ao setor químico – produção de detergente, fármacos e pesticidas, aplicação como biosensor, na proteção ambiental, etc (PANDEY *et al.*, 1999; PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001). Dentre os produtos obtidos em meios aquosos, destacam-se: astaxantina (corante de alimentos); ácido 4-hidroxidecanóico (precursores de aromas); éster  $\gamma$ -decalactona (sabor de frutas); ácidos dicarboxílicos para a indústria de pré-polímeros; ácidos graxos polinsaturados do tipo ômega-3 e ômega-6 etc. Quanto aos produtos obtidos em meio orgânico têm-se: triglicerídeos, esteróides, emulsificantes, análogos de manteiga de cacau, diacilglicerol etc (CASTRO *et al.*, 2004).

Atualmente, as características de estereoespecificidade, quimiosseletividade, esterosseletividade, seletividade proquiral, especificidade e/ou regioseletividade que muitas lipases possuem têm sido o principal alvo para novos estudos e aplicações industriais (COSTA e AMORIM, 1999). As lipases tipicamente estudadas, devido sua enantioseletividade, são de origem bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium viscosum*, *Bacillus subtilis*, *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp. e *Serratia marcescens*) e fúngica (*Candida antarctica* e *Candida rugosa*). Contudo, apesar de um grande número de publicações nesta área, o número de processos enantioseletivos industriais baseado em reações catalisadas por lipases é limitado. Os principais entraves desta aplicação são: (i) a insuficiente enantioseletividade; (ii) atividade enzimática restrita; (iii) dificuldade na reutilização das lipases; e (iv) inerente limitação prática da cinética já que 50% de conversão é o máximo possível de ser obtido (JAEGER e REETZ, 1998). Tais entraves podem ser suavizados e/ou eliminados com o uso de biocatalisadores imobilizados, sendo necessário para tanto investir em maiores estudos de imobilização das enzimas acima mencionadas de forma a desenvolver um protocolo compatível com processos enantioseletivos.

Outro destaque tem sido no desenvolvimento de sínteses em meios livres de solventes. A aplicação desta técnica traz como vantagens: maior concentração de substrato; reduzida perda de carga do processo e eliminação do custo do solvente e da etapa de separação (SANDOVAL *et al.*, 2002; FORESTI, ALIMENTI e FERREIRA, 2005). Algumas das sínteses já estudadas por este método são: síntese de monoglicerídeos (LANGONE *et al.*, 2002); síntese de ésteres de cadeia curta de citronila (MACEDO, LOZANO e PASTORE, 2003); síntese de oleato de etila (FORESTI, ALIMENTI e FERREIRA, 2005); síntese de oleato de butila (GHAMGUI, KARRA-CHAABOUNI e GARGOURI, 2004); transesterificação de esteróis da madeira (MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

### **2.2.3 Lipases Imobilizadas e as Particularidades de sua Imobilização**

Um aumento no número de aplicações de lipases em sínteses e biotransformações demanda um biocatalisador imobilizado eficiente para uso. A imobilização possibilita o reuso de lipases caras, como também, pode melhorar a estabilidade e a atividade da enzima. Muitos métodos têm sido usados para imobilizar lipases, incluindo adsorção ou precipitação em materiais hidrofóbicos,

---

ligação covalente a grupos funcionais, imobilização em gel, adsorção em resina de troca iônica macroporosa e microencapsulamento em vesículas de lipídios (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Além disso, a variedade de suportes utilizados é notória, destacando-se a imobilização de lipase em poli(propileno), poli(metil-metacrilato), poli(estireno), poli(cloreto de vinila), quitosana, quitina, resina aniônica e poli(propileno) (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). O uso de agentes gelificantes naturais, como gelatina, agarose e k-carragenanas, também tem sido testado para a formação de organo-gel de microemulsão, bem como hidrogéis (STAMAKIS e XANAKIS, 1999).

#### 2.2.3.1 Lipase imobilizada por adsorção

Na literatura existe um grande número de publicações com aplicações de lipases imobilizadas por adsorção física. Inicialmente, os suportes mais utilizados para a imobilização destas enzimas eram vidro de porosidade controlada, terra diatomácea, sílica e alumina, contudo, recentemente os suportes mais usados para esta técnica são as resinas de troca iônica, celite e biopolímeros (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Como consequência do processo de imobilização, a maioria das lipases exibe um valor de temperatura ótimo maior do que o da enzima solúvel enquanto que o pH ótimo é levemente alterado para valores mais alcalinos (VILLENEUVE *et al.*, 2000; DENG *et al.*, 2004).

A imobilização de lipases por adsorção, além dos fatores típicos relacionados ao processo de adsorção de qualquer enzima (temperatura de imobilização, pH do meio de imobilização, tempo de contato etc), encontra particularidades, que estão relacionadas não só à classe lipase, mas também à origem da mesma. As principais particularidades reportadas na literatura são: uso de aditivos ou solventes; influência do caráter hidrofílico-hidrofóbico do suporte e influência da concentração de lipase durante o processo de imobilização.

##### a) Uso de aditivos ou solventes

O uso de aditivos ou solventes durante o processo de imobilização, com o intuito de melhorar a eficiência, tem sido descrito na literatura (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998). Suportes pré-tratados com solventes polares, tais como etanol ou iso-propanol, têm um rendimento de adsorção maior frente ao suporte não tratado. O

---

solvente polar, quando em contato com o suporte, “absorve” as moléculas de água, favorecendo a adsorção (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). Uso de solventes apolares também é referenciado, por exemplo, octano e hexano. Em geral, o uso deste se dá como uma segunda etapa do processo de imobilização, após algumas horas de contato entre a enzima e o suporte, a enzima imobilizada é submetida a uma mistura tampão/hidrocarboneto. O objetivo é promover a ativação interfacial da enzima (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998; FORESTI, ALIMENTI e FERREIRA, 2005).

São inúmeros os aditivos usados no processo de imobilização por adsorção, por exemplo, albumina, gelatina, caseína, glutaraldeído e poli(etilenoglicol) (PEG). O uso de proteínas como albumina e caseína tem por objetivo reduzir o efeito de espalhamento provocado pela alta afinidade entre alguns suportes e as lipases. O glutaraldeído promove maior eficiência ao processo de imobilização, estabilizando as interações da enzima com o suporte (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Quanto ao PEG, a presença do mesmo afeta o nível de hidratação da enzima através da modificação da hidrofiliicidade nas proximidades da enzima, promovendo uma maior ativação de certas enzimas, principalmente em lipases (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; ROCHA, GIL e GARCIA, 1998; SOARES *et al.*, 2003).

#### b) Influência do caráter hidrofílico-hidrofóbico do suporte

Suportes hidrofóbicos são comumente utilizados na imobilização de lipases por adsorção. Isto porque a superfície hidrofóbica assemelha-se a interface que induz à mudança conformacional das lipases, a qual é necessária para tornar livre o acesso dos substratos ao sítio ativo, promovendo a ativação da enzima. Além disso, a superfície hidrofóbica induz a lipase a se adsorver numa orientação que favoreça a exposição do sítio ativo aos substratos (BLANCO *et al.*, 2004). Outra característica de suportes hidrofóbicos é que estes agem como um adsorvente seletivo na imobilização de lipases, sendo observado um curto tempo de adsorção a baixas forças iônicas. Tal comportamento é totalmente contrário ao normalmente observado em adsorção de proteínas, em que se observa melhor adsorção com maior força iônica do meio (BASTIDA *et al.*, 1998).

A imobilização de lipases em suportes hidrofílicos pode reduzir a atividade enzimática devido a mudanças conformacionais. Os materiais hidrofílicos podem

---

reduzir a solubilidade de substratos hidrofóbicos em regiões hidrofílicas e o acesso dos substratos ao sítio ativo. Em alguns casos a matriz pode impor uma barreira estérea, resultando em rigidez na estrutura da enzima (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

Em paralelo, o material usado como suporte para a imobilização vai influenciar na quantidade de água total nas proximidades da enzima, e a partição dos reagentes e/ou produtos na mistura reacional (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). Em reações de esterificação, tem-se reportado que suportes hidrofílicos proporcionam efeito inibidor do doador do grupo acila sobre a lipase imobilizada para certos limites de concentrações (CHEN, 1996). Contudo, neste mesmo estudo, Chen observou que o uso de géis como suporte aumenta a tolerância da enzima ao efeito inibidor do álcool, possibilitando o uso de altas concentrações de etanol para a obtenção de um maior rendimento. Em reações de hidrólise, o uso de suportes hidrofílicos geralmente favorece a catálise por lipases imobilizadas (VILLENEUVE *et al.*, 2000; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

#### c) Influência da concentração de lipase durante o processo de imobilização

O excesso de lipase fornecida para adsorção pode acarretar na formação de agregados protéicos ou adsorção em multicamadas, reduzindo a eficiência catalítica do derivado obtido, haja vista a grande tendência destas enzimas em formarem agregados (BLANCO *et al.*, 2004). Lipase tipo B de *C. antarctica* suportada em poli(propileno) mostrou eficiência elevada quando se utilizou uma pequena quantidade do biocatalisador (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). Contudo, concentrações muito baixas podem promover um efeito de espalhamento da enzima sobre o suporte, causando mudanças conformacionais que promovem a perda de sua atividade catalítica (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

#### 2.2.3.2 Lipase imobilizada por ligação covalente

Como citado anteriormente no item 2.1.2.2, existem vários métodos e agentes funcionalizantes para ativar um suporte. No caso de imobilização de lipases por ligação covalente, o agente funcionalizante mais utilizado é o glutaraldeído. Este composto facilmente se polimeriza formando polímeros que contêm  $\omega$  aldeídos insaturados que podem reagir com os grupos amina do suporte. Outro método

---

largamente usado é do brometo de cianogênio. Ele é aplicado em suporte que possuem grupos  $\omega$  glicóis, como agarose, celulose ou resina Sephadex. Embora esta técnica seja bem difundida, a quantidade de estudos imobilizando lipases por ligação covalente é bem menor frente à imobilização por adsorção (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Bem como na imobilização por adsorção, o uso de aditivos e solventes também é observado na imobilização de lipases por ligação covalente (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998). A influência do meio de imobilização e do tipo de grupo funcional ao qual a enzima irá se ligar também são fatores importantes na imobilização por ligação covalente.

Stark e Holmberg (1989) avaliaram a influência do meio em que ocorre o processo de imobilização (tampão aquoso, hexano ou microemulsão) na atividade catalítica do derivado obtido. As atividades hidrolíticas de lipases imobilizadas na presença de diferentes meios dispersantes foram praticamente iguais, sendo levemente maior quando se utilizou microemulsão. Contudo, quando eles avaliaram a atividade catalítica em uma reação de transesterificação, observaram que a lipase imobilizada a partir de um meio aquoso mostrou-se completamente inativa. As imobilizadas na presença de hexano e microemulsão mostraram, respectivamente, 22% e 43% da atividade da enzima livre. Tal comportamento deve-se, provavelmente, à ligação de resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo, alterando a conformação do mesmo. Na reação de transesterificação, as duas cavidades ligantes do sítio ativo são importantes, o que torna a atividade catalítica de transesterificação mais sensível que a atividade hidrolítica.

Além do meio de imobilização, a influência dos grupos funcionais também foi estudada. Diferentes resinas epóxi funcionalizadas com diferentes grupos (epóxi-iminodiacético-Sepabeads, IDA, epóxi-etilenodiamina-Sepabeads, EDA e quelatos epóxi-cobre-Sepabeads, IDA-Cu<sup>2+</sup>), foram estudadas para a imobilização de lipase de *Mucor miehei* por ligação covalente (PALOMO *et al.*, 2003b). Os derivados obtidos foram utilizados na resolução do ácido (R,S)-2-butil-2-fenilacético, em diferentes condições de temperatura e pH. As propriedades catalíticas, atividade, especificidade e enantiosseletividade, foram dependentes do tipo de suporte utilizado.



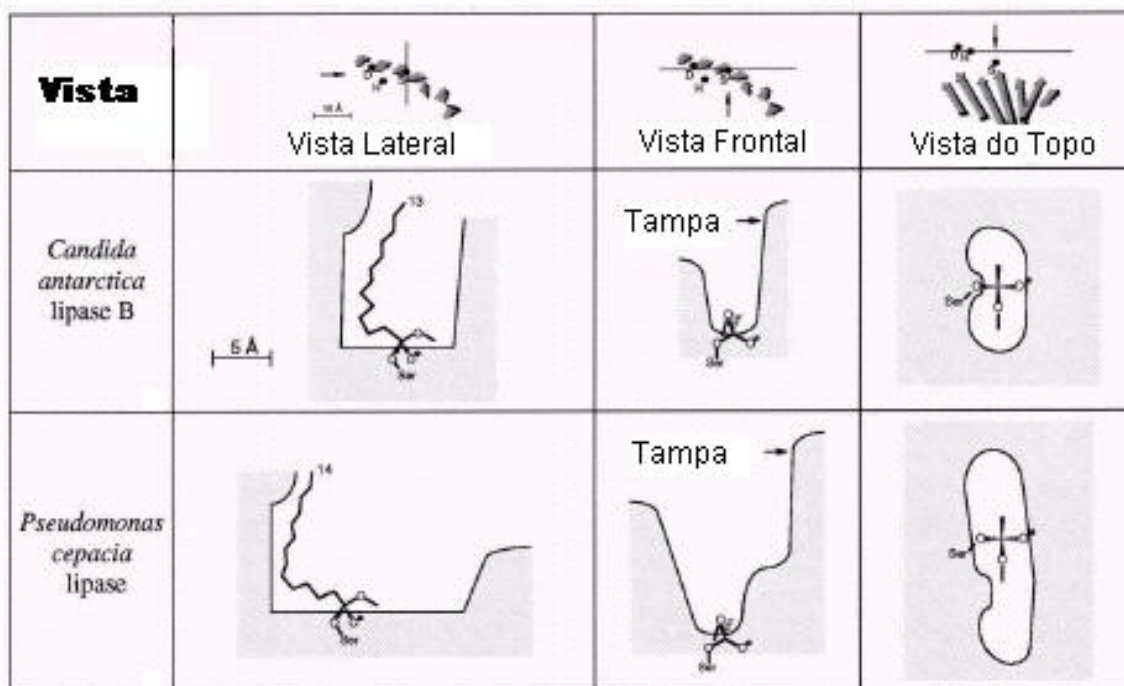
## 2.2.4 Lipase tipo B de *Candida antarctica*

Apesar de possuírem similar tríade catalítica e agirem no processo de hidrólise de ésteres sob o mesmo mecanismo catalítico, a fonte de obtenção da lipase influencia no conjunto de aminoácidos presentes na estrutura da enzima, bem como na conformação da cavidade ligante de substratos. Além disso, é possível também encontrar diferença entre lipases da mesma fonte.

A levedura *Candida antarctica*, por exemplo, é capaz de produzir duas diferentes lipases, chamadas de A e B, com diferentes pontos isoelétricos (pI), massas molares e seletividades. A lipase tipo A de *C. antarctica* tem massa molar igual 45 kDa, pI de 7,5 e, apesar de não ser específica, é mais termoestável. A lipase tipo B de *C. antarctica* (CAL B), enzima utilizada neste trabalho, possui pH ótimo entre 7 e 8 (PETERSEN, FOJAN e PETERSEN, 2001), massa molar igual a 33 kDa, pI de 6,0, dimensões aproximadas de  $30 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$ , e demonstra ser bastante estereoespecífica em hidrólises e sínteses orgânicas (UPPENBERG *et al.*, 1994).

### 2.2.5.1 Características específicas da lipase tipo B de *Candida antarctica*

Como dito anteriormente, a fonte da lipase influencia na conformação da cavidade catalítica. No caso específico da CAL B, a cavidade ligante do substrato é elíptica, com o formato de um funil íngreme de  $9,5 \times 4,5 \text{ \AA}$ . As paredes do tubo diferem na altura, podendo ser vistas através do eixo álcool-ácido (Figura 2.6, visão frontal). Assim, o substrato é orientado paralelamente ao eixo longitudinal. Comparando a CAL B com a lipase de *Pseudomonas cepacia*, a cavidade possui formato distinto. Diferenças mais abruptas podem ser vistas para outras lipases (PLEISS, FISCHER e SCHMID, 1998). As paredes desse canal são bastante hidrofóbicas, contudo, na parte superior do sítio ativo há apenas uma pequena área hidrofóbica (UPPENBERG *et al.*, 1994; PLEISS, FISCHER e SCHMID, 1998), o que favorece a CAL B a não formar bioagregados (PALOMO *et al.*, 2004).



**Figura 2.6:** Formato da cavidade ligante de lipase tipo B de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* (PLEISS, FISCHER e SCHMID, 1998).

No item 2.2.1 do presente capítulo, foram abordadas algumas características consensuais às lipases, contudo, a CAL B possui algumas diferenças da maioria das lipases. A primeira delas está relacionada à seqüência próxima ao sítio ativo. Enquanto a maioria das lipases mostra uma formação GxSxG, a CAL B possui a seqüência TWSQG, com a treonina substituindo a glicina (UPPENBERG *et al.*, 1994). Outra característica é que a lipase tipo B de *C. antarctica* não é tão eficiente como outras lipases na hidrólise de triglicerídios (UPPENBERG *et al.*, 1994). CAL B possui alta atividade para ácidos graxos de cadeias curtas e médias e baixa atividade para cadeias longas (PLEISS, FISCHER e SCHMID, 1998). Contudo, a alta estereoseletividade e estereoespecificidade em substratos quirais despertam grande interesse no uso desta lipase (UPPENBERG *et al.*, 1994). Estudos têm mostrado que esta enzima é bastante estereoseletiva, principalmente para álcoois secundários (UPPENBERG *et al.*, 1995).

No que diz respeito à imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica*, considerando que esta é uma das poucas lipases que não sofre o fenômeno de ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998), tem-se observado que a imobilização em suportes hidrofóbicos não apresenta hiper-ativação da enzima imobilizada. Além disso, quando Blanco *et al.* (2004) realizaram a imobilização de CAL B em sílica

---

hidrofobizada com grupos octil, observou-se que as interações hidrofóbicas entre a enzima imobilizada e o suporte afetaram negativamente a estrutura terciária da CAL B, promovendo uma queda na atividade da enzima. Tal observação fornece indícios de que o uso de suportes altamente hidrofóbicos pode, em algumas circunstâncias, reduzir a eficiência de imobilização da CAL B.

#### 2.2.4.2 Aplicações da lipase tipo B de *Candida antarctica*

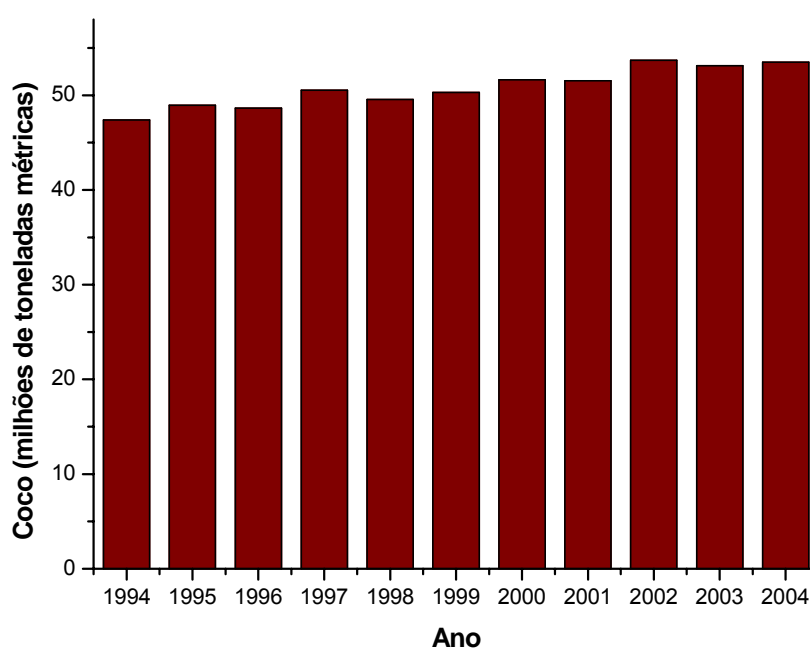
Lipase tipo B de *C. antarctica* é comercializada na forma solúvel ou imobilizada por empresas como: Novo Nordisk (detentora de maior parte do mercado), Boehringer Mannheim e Roche Diagnostics. Estes biocatalisadores destinam-se a reações tanto em meio aquoso quanto orgânico, tendo sido reportado o uso em reações livres de solvente (FORESTI e FERREIRA, 2005) e em fluidos supercríticos (FEIHRMANN, 2005).

Dentre as potenciais aplicações da lipase tipo B de *C. antarctica* em processos industriais, encontram-se:

- Síntese de compostos opticamente ativos na indústria farmacêutica (STRAATHOF, PANKE e SCHMID, 2002; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2001; ARROYO, SÁNCHEZ-MONTERO e SINISTERRA, 1999);
- Síntese de ésteres usados na indústria de aromas (LOZANO *et al.*, 2002);
- Síntese de oleato de cetila, um análogo do óleo de cachalote que possui importantes aplicações em indústrias de cosméticos, lubrificantes, alimentos e fármacos (CASTRO *et al.*, 2004);
- Síntese de lactato de butila, éster bastante utilizado em indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica por possuir propriedades higroscópicas, emulsificantes e esfoliantes (PIROZZI e GRECO JUNIOR, 2004).
- Síntese de ésteres de vitaminas, objetivando tornar estas últimas solúveis em óleo para adição em produtos alimentícios (MAUGARD e LEGOY, 2000; ADAMCZAK, BORNSCHEUER e BEDNARSKI, 2005);
- E outras como esterificação de açúcares (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2003) e glicidol (PALOMO *et al.*, 2005).

### 2.3 COCO: ESTADO DA ARTE DA CADEIA PRODUTIVA

A cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma atividade agrícola que tem grande importância em mais de 86 países, seja na geração de divisas, emprego, renda ou alimentação para a população (CUENCA *et al.*, 2002). Dentre estes países, destacam-se Indonésia, Filipinas e Índia como os principais produtores mundiais, os quais são responsáveis por mais de 70% da produção mundial (FAO, 2005a). Nos últimos 10 anos, a produção mundial teve um leve crescimento (Figura 2.7), sendo Brasil, Indonésia e Filipinas os principais responsáveis por tal acontecimento.

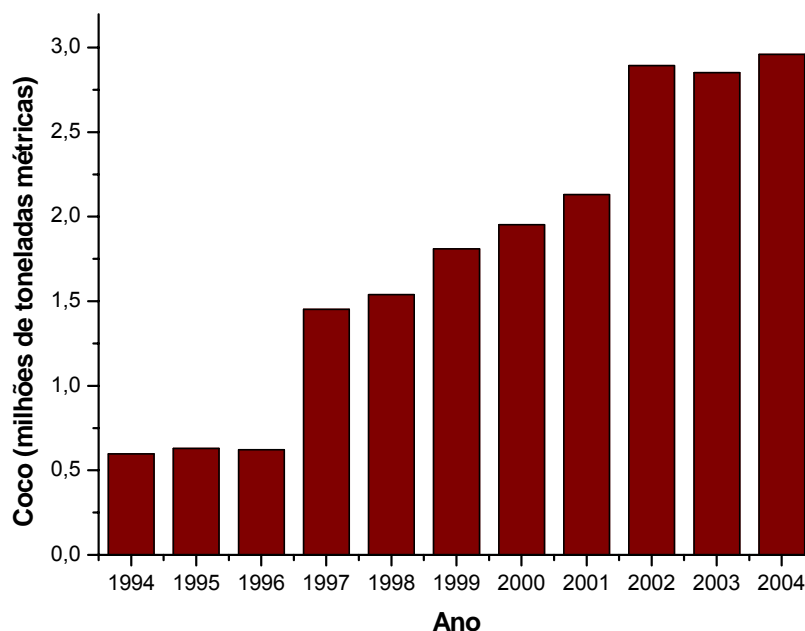


**Figura 2.7:** Produção mundial de coco nos últimos anos (FAO, 2005b).

No Brasil, o coqueiro é cultivado predominantemente no litoral da Região Nordeste, representando 95% da área colhida e 79% da produção brasileira (CUENCA *et al.*, 2002). Em 2003, os três maiores produtores brasileiros foram, em ordem decrescente, Bahia, Pará e Ceará (IBGE, 2005).

Nos últimos 10 anos, teve-se um considerável aumento na produção brasileira de coco. Tal fenômeno se deu devido à elevação da demanda de coco no mercado e ao desenvolvimento de híbridos com maior produtividade (Figura 2.8). A Região Sudeste foi a principal responsável por este crescimento, e hoje ela se destaca por deter a maior produtividade nacional. Segundo Cuenca *et al.* (2002), esta região possui grandes vantagens de localização em relação ao Nordeste, no que se refere

à expansão de novos plantios de coco das espécies Anão e Híbrido, haja vista que, além de possuírem melhores condições de mercado, tais como: maior número de consumidores, maior renda per capita, melhor possibilidade de estabelecimento de indústrias processadoras – possuem ainda condições de fornecer o produto ao consumidor final a um preço menor, em razão das curtas distâncias e da facilidade de escoamento da produção e dos insumos por melhores vias.



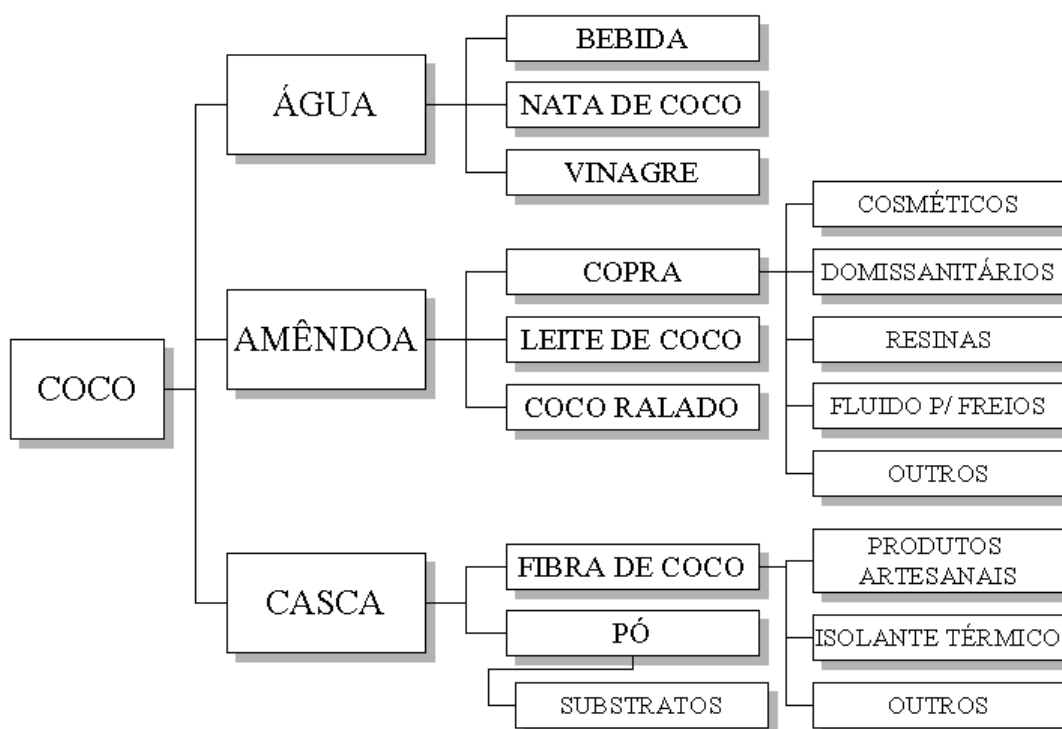
**Figura 2.8:** Produção brasileira de coco nos últimos anos (FAO, 2005b).

Segundo dados levantados pela Associação Brasileira de Produtores de Coco – Abrascoco, 35% da produção brasileira destinam-se às agroindústrias (sendo que 99% destes 35% são constituídos de coco maduro destinados à indústria de coco ralado e leite de coco), 35% destinam-se aos mercados Suldeste/Sul (90% são de frutos verdes) e 30% ficam no mercado nordestino (dos quais 80% são coco maduro). Assim, estima-se que apenas 35% do coco consumido no mercado brasileiro seja coco verde. Tal distinção entre coco verde e maduro encontra-se não somente na idade do fruto como também nas suas propriedades físicas e químicas, o que resulta em aplicações distintas.

### 2.1.1 Coco Maduro

Considera-se coco maduro (coco seco) aquele cujo albúmen sólido encontra-se na forma rígida e no seu peso máximo, o que acontece entre o 11º e o 12º mês de idade, e é quando o mesmo passa a ser utilizado para fins culinários ou agroindustriais (ARAGÃO *et al.*, 2002).

Desde a aplicação econômica mais importante, obtenção da copra, até uso remediativo causado pelo excesso de subprodutos, como uso das fibras como combustível sólido, muitas são as alternativas de uso do coco maduro (Figura 2.9).



**Figura 2.9:** Alternativas de uso do coco maduro (NUNES, 2002).

A amêndoa é a fração do coco mais visada na indústria do coco maduro, haja vista a importância comercial dos produtos obtidos a partir da mesma. Enquanto isso, a casca do coco, que representa cerca de 57% do fruto (valor sujeito a alterações de acordo com as condições edafoclimáticas da região de plantio e da variedade cultivada), é considerada um subproduto cujo destino, no Brasil, é majoritariamente a incineração ou o lixo (NUNES, 2002).

A casca de coco maduro é formada, em média, por 30% de fibra e 70% de pó. Segundo Nunes (2002), *a demanda mundial de fibra e pó está crescendo*

vertiginosamente, em razão do interesse manifesto pelos países ocidentais por produtos que não causam impacto ao meio ambiente. Desta forma, há uma tendência mundial de modificar a atual condição de subprodutos do pó e da fibra fazendo dos mesmos uns dos principais produtos do coco.

As fibras obtidas a partir da casca de coco maduro, também denominadas de fibras marrons, são, em torno de 56%, compostas por fibras longas (Tabela 2.2), o que favorece seu emprego na produção de artigos artesanais (produção de esteiras, cordas, tapetes e outros). Além de produtos artesanais, as fibras possuem diversas aplicações tradicionais como: impregnada com látex para uso na manufatura de colchões de mola, estofamento de carros, almofadas, etc; fabricação de placas usadas como isolante térmico e acústico; manufatura de plástico; produção de substâncias usadas como adesivos e emulsificantes. Estudos recentes têm demonstrado outras aplicações em potencial como: produção de carvão ativado utilizado na adsorção de metais pesados (NAMASIVAYAM e SANGEETHA, 2005), produção de compósitos (AGOPYAN *et al.*, 2005; BRAHMAKUMAR, PAVITHRAN e PILLAI, 2005; TOLEDO FILHO *et al.*, 2005; WAMBUIA, IVENS e VERPOEST, 2003) e produção de biofiltros para tratamento de efluentes gasosos (VAN GROENESTIJN e KRAAKMAN, 2005; RAMÍREZ-LÓPEZ *et al.*, 2003).

**Tabela 2.2:** Propriedades físicas e químicas da fibra de coco maduro

Propriedades	Valores
Largura da fibra ( $\mu$ ) <sup>a</sup>	222
Distribuição do comprimento (% de toda a fibra) <sup>a</sup>	
Fibras longas (acima de 15,24 cm)	56
Fibras médias (10,16 a 15,24 cm)	21
Fibras curtas (abaixo de 10,16 cm)	23
Tenacidade (g/tex) <sup>a</sup>	13,28
Elongação (%) <sup>a</sup>	29,04
Módulo de rigidez (dynes/cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	1,89
Lignina (%) <sup>b</sup>	32,7

**Tabela 2.2:** Propriedades físicas e químicas da fibra de coco maduro (Continuação)

Propriedades	Valores
$\alpha$ -celulose (%) <sup>b</sup>	36,3
Hemicelulose (%) <sup>b</sup>	12,4
Cinzas (%) <sup>b</sup>	3,4

<sup>a</sup> Valores reportados por Prabhu, 1959 *apud* Basak, Bhaduri e Paul, 1983;

<sup>b</sup> Valores reportados por Van Dam *et al.*, 2004.

Quanto ao pó da casca de coco, maior composição da casca de coco maduro, devido a sua alta capacidade de retenção de água, decomposição lenta, capacidade de troca de cátion, condutividade elétrica e alta porosidade total (Tabela 2.3) possui grande aplicação como substrato agrícola podendo também ser usado na produção de adubos.

**Tabela 2.3:** Propriedades físico-químicas e químicas do pó de coco maduro (NUNES, 2002).

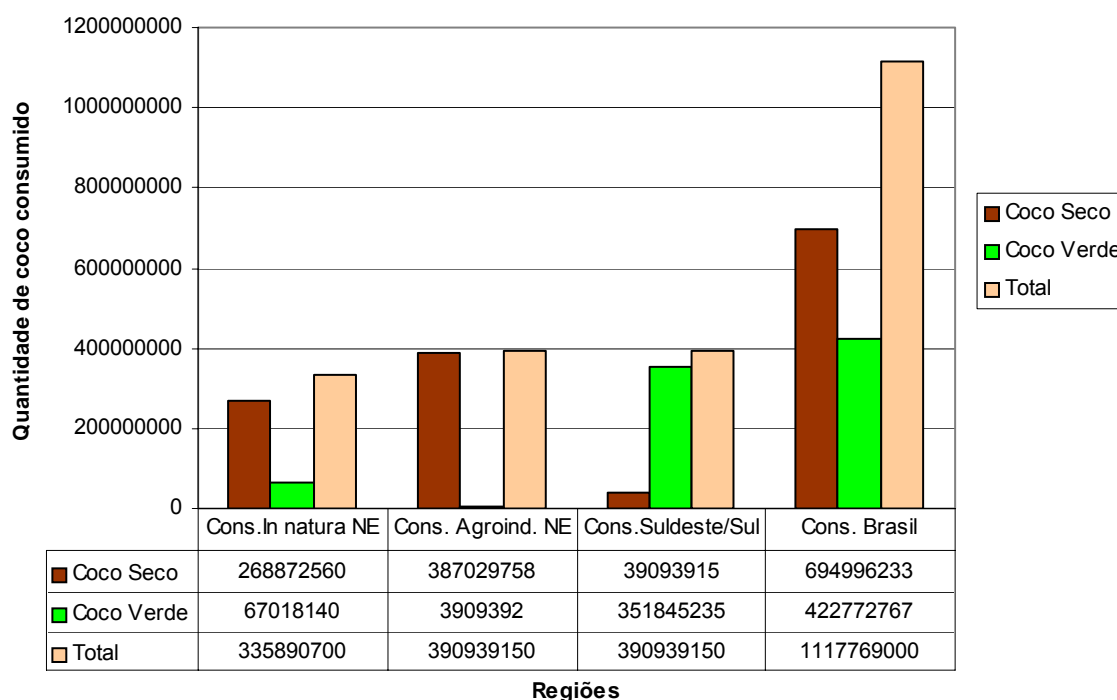
Propriedades	Valores
Condutividade elétrica (dS/cm)	0,4 a 6
Capacidade de troca de cátions (m.e./100g)	30 a 95
PH	4,9 a 6,0
Matéria orgânica (%)	91 a 95
Fosfato (mg/kg)	4 a 28
Nitrogênio total (g/kg)	4 a 6
Potássio (g/kg)	1,2

### 2.1.2 Coco Verde

Denomina-se de coco verde o fruto do coqueiro ainda em maturação. Considerando que seu uso destina-se basicamente para obtenção de água de coco, o mesmo é coletado entre o 6º e o 7º mês, que é quando o coco atinge seu volume máximo de água (ARAGÃO *et al.*, 2002) e quando a água apresenta maior quantidade de açúcares não-redutores (ROSA e ABREU, 2000).



Apesar da produção de coco verde representar menos da metade da produção total de coco (Figura 2.10), a sua oferta vem demonstrando crescimento significativo no mercado brasileiro. Este crescimento é uma consequência da aplicação de tecnologias de processamento e conservação da água de coco verde, viabilizando o comércio desse produto e otimizando o seu aproveitamento.



**Figura 2.10:** Produção brasileira de coco verde e maduro em 1999 (CUENCA *et al.*, 2002).

A água de coco concorre com o mercado de refrigerantes e bebidas isotônicas, representando, segundo estimativas da Associação Brasileira de Produtores de Coco – Abrascoco, cerca de 1,4% desse consumo, estimado em 10 bilhões de litros/ano. Isto dá uma dimensão das possibilidades de crescimento do consumo de água-de-coco, justificando a pretensão da Abrascoco de atingir 5% do mercado de refrigerantes e isotônicos, ou seja 500 milhões de litros/ano, além da perspectiva de exportação do coco verde para atender à demanda por água de coco durante o verão europeu.

No processo de obtenção da água de coco, a casca de coco verde aparece como um resíduo, não tendo aplicação para a agroindústria em questão. E, como consequência desse aumento de consumo de água de coco, uma grande

quantidade de resíduo vem sendo gerada. Tal geração representa um problema sério de descarte, principalmente nos grandes centros urbanos, onde o material é disposto em lixões e aterros sanitários e, por ser volumoso e de degradação lenta, gera impactos ambientais significativos (ROSA *et al.*, 2002a). Só em termos da emissão de metano, estima-se que a deposição de casca de coco em aterros e vazadouros promovam a emissão de 17,9 Gg de metano/ano em todo território brasileiro, o que representa 0,6% das emissões de metano provocadas por todos os resíduos sólidos urbanos (PASSOS, 2005).

Estudos recentes realizados por Dey *et al.* (2003) detectaram a presença de ácidos fenólicos na casca de coco verde (13 mg de fenólicos totais/g de material seco) sendo estes existentes, predominantemente, na forma ligada à parede celular. Tal descoberta impulsionou Dey, Chakraborty e Mitra (2005) a quantificarem alguns fenólicos de cunho comercial importantes na casca de coco verde (Tabela 2.4). Os valores obtidos foram com base em frutos com idade entre 6 e 8 meses. Em paralelo, Brígida e Rosa (2003) avaliaram o teor de taninos condensados presente na casca de coco verde. Os resultados mostraram que os taninos condensados representam 6,03%, em base seca, da casca de coco verde – valor este inferior ao presente na casca de acácia negra (principal fonte de taninos condensáveis comercial) e superior a outras espécies vegetais.

**Tabela 2.4:** Níveis de fenólicos ligados à parede celular na casca de coco verde (DEY, CHAKRABORTY e MITRA, 2005).

Composto	Valor ( $\mu\text{g/g}$ de massa seca)
Ácido 4-hidroxibenzóico	2783
4-hidroxibenzaldeído	16,6
Ácido Fólico	145,6
Ácido 4-Cumárico	189,9
Ácido Vinílico	74,7

Selvam, Nair e Singh (1998) observaram que 78% da casca de coco verde é composta de umidade e materiais voláteis, sendo possível encontrar compostos como:  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$  e  $\text{MnO}_2$ . Em média, 72,8% da massa seca

corresponde à matéria orgânica (Tabela 2.5), sendo cerca de 35 a 45% lignina e 23 a 43%, celulose (CARRIJO, LIZ e MAKISHIMA, 2002).

**Tabela 2.5:** Caracterização química da casca de coco verde (ROSA *et al.*, 2002).

<b>Composto</b>	<b>Valor</b>
Nitrogênio (g/kg)	6,52
Fósforo (g/kg)	1,42
Potássio (g/kg)	11,5
Cálcio (g/kg)	6,8
Magnésio (g/kg)	1,79
Sódio (g/kg)	12,5
Ferro (mg/kg)	1973,0
Cobre (mg/kg)	6,6
Zinco (mg/kg)	31,8
Manganês (mg/kg)	23,3
Matéria Orgânica (%)	72,58

Basak, Bhaduri e Paul (1983) avaliaram algumas propriedades físicas e químicas da fibra de coco verde (Tabela 2.6). Comparando as propriedades da fibra do coco verde com a fibra do coco maduro, observou-se que, apesar de haver maior percentagem de fibras médias e curtas no coco verde, propriedades importantíssimas como tenacidade, alongação e módulo de rigidez mostraram-se bastante próximas. Estes autores encontraram que o teor de lignina representa 30,35% do material em massa seca. Contudo, Van Dam (2004) referenciou em seu trabalho que, para a fibra de coco verde de 6 a 7 meses, o teor de lignina varia entre 20 e 25%. Vale salientar que as fibras obtidas por Basak, Bhaduri e Paul (1983) sofreram um processo de extração microbiológico, podendo tal processo ter influenciado nos resultados obtidos. Além dos compostos comumente encontrados em materiais de origem vegetal como lignina e celulose, Selvam, Nair e Singh (1998) encontraram uma grande quantidade de silício na fibra de coco.

**Tabela 2.6:** Propriedades físicas e químicas da fibra de coco verde (BASAK, BHADURI e PAUL, 1983)

Propriedades	Valores
Largura da fibra ( $\mu$ )	191
Distribuição do comprimento (% de toda a fibra)	
Fibras longas (acima de 15,24 cm)	30
Fibras médias (10,16 a 15,24 cm)	57
Fibras curtas (abaixo de 10,16 cm)	13
Tenacidade (g/tex)	11,0 – 13,0
Elongação (%)	26,0 – 29,0
Módulo de rigidez (dynes/cm <sup>2</sup> )	1,85
Lignina (%)	30,35
$\alpha$ -celulose (%)	37,70
Cinzas (%)	0,73

Algumas características do pó de coco verde foram avaliadas por Cordão Terceiro Neto *et al.* (2004). Considerando o objetivo de seu estudo, uso do pó da casca de coco verde como substrato agrícola para produção de Violeta Africana, apenas características químicas de interesses agrônômicos foram determinadas (Tabela 2.7).

**Tabela 2.7:** Características químicas do pó de coco verde como substrato (CORDÃO TERCEIRO NETO *et al.*, 2004).

Parâmetro	Valor
Nitrogênio total (g/Kg)	26,47
Fosfato (g/Kg)	6,12
Potássio (g/Kg)	49,53
Cálcio (g/Kg)	1,7
Sódio (g/Kg)	15,5

---

Dentre os grupos funcionais presentes no pó de coco destaca-se: o O–H, de álcool ou fenol; o C–C, de anel aromático e, o C–O. Quanto a aldeídos, cetonas e ésteres, estes encontram-se abaixo do limite de detecção por análise de infravermelho ou estão ausentes no pó (PINO, 2005).

Levando-se em conta de que a casca de coco verde, e conseqüentemente seus derivados, são um material rico em micronutrientes, e com propriedades físicas, físico-químicas e químicas de grande interesse para diversas aplicações, é lamentável que atualmente o destino da mesma seja, em sua maioria, os aterros e lixões. O que faz necessário estabelecer formas de aproveitamento desses resíduos que possam contribuir para aumentar a competitividade da cadeia produtiva do coco verde, em consonância com os princípios e objetivos do desenvolvimento sustentável, tendo em vista que a geração de resíduos pelo homem é um dos fatores que mais contribui para a degradação do meio ambiente, como poluição das reservas hídricas e do solo.

Como resposta a esta demanda sócio-ambiental, algumas formas de aproveitamento deste resíduo vem sendo estudadas. Os estudos de aproveitamento da casca de coco verde e seus derivados (endocarpo, fibra e pó) variam desde sua aplicação agronômica até a utilização em processos biotecnológicos (ver Apêndice A). Contudo, apesar destes estudos, novos esforços por geração de mais alternativas são necessários a fim de que tal resíduo, atualmente produzido em grandes quantidades, possa ter outro destino senão os aterros e lixões. Tal ação, além de contribuir para o desenvolvimento sustentável do País, contribuirá para solução de um problema ambiental vivenciado por cidades cuja produção de casca de coco é grande, impedindo assim que seus aterros e lixões tenham sua vida útil reduzida pela presença de grandes quantidades deste resíduo.

Ciente desta demanda ambiental e considerando que materiais lignocelulóticos são bastante utilizados como sorventes (HARTUNG, MARTINEC e JUNGBLUTH, 2001; RAMÍREZ-LÓPEZ *et al.*, 2003) – sendo empregado inclusive na imobilização de enzimas (D´SOUZA e GODBOLE, 2002; DEY, NAGPAL e BANERJEE, 2002; GOMES *et al.*, 2005) – o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial da utilização da fibra da casca de coco verde como suporte para a imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica*. A partir deste estudo, buscou-se gerar dados técnicos para oferecer uma alternativa de aproveitamento de um

resíduo agroindustrial, além de contribuir para a expansão e diversificação da tecnologia enzimática, trazendo potenciais benefícios sócio-econômicos através do desenvolvimento de uma tecnologia inovadora.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo, referencia-se os principais materiais utilizados, bem como a descrição das metodologias aplicadas ao estudo do potencial da fibra de coco verde como suporte para a imobilização de lipase.

### 3.1 MATERIAIS

#### 3.1.1 Enzimas

A fim de avaliar o potencial da fibra de casca de coco verde como suporte, estudos foram realizados utilizando solução bruta de lipase de *Candida antarctica* tipo B (CAL B), gentilmente cedida pela Novozymes Latin America Ltda, Paraná, Brasil. Dois lotes de enzima foram utilizados, a Tabela 3.1 mostra as especificações das soluções de CAL B.

**Tabela 3.1:** Especificações dos lotes de lipase tipo B de *C. antarctica* utilizados.

Especificações	Lote 1 (CAL B – L1)	Lote 2 (CAL B – L2)
Código da Novozyme	LCN 0200	LCN 02100
Atividade hidrolítica (U/mL)	1.638,00 ± 109,0	3.313,16 ± 268,8
Teor total de proteína (mg/mL)	5,92 ± 0,1	12,55 ± 0,2
Atividade específica (U/g de proteína em solução)	≈ 276,69	≈ 264,00

#### 3.1.2 Suporte

No presente trabalho, utilizou-se casca de coco verde coletada em postos de venda de água de coco para obtenção da fibra a ser utilizada como suporte. O processo de obtenção da fibra, desenvolvido pela Embrapa Agroindústria Tropical (ROSA *et al.*, 2002c), consiste em submeter a casca a trituração (em triturador helicoidal com motor trifásico de 30 HP), seguida de prensagem e classificação (em classificadora com motor trifásico de 5 HP e cilindro classificador que permite obter três frações granulométricas diferentes de pó e uma fração de fibra), ver Figura 3.1.

Para uso nos experimentos, as fibras obtidas pelo processo anteriormente descrito foram selecionadas e cortadas de forma a atingirem a granulometria de 32 a 35 mesh.



**Figura 3.1:** Fluxograma do processo de obtenção da fibra de casca de coco verde.

### 3.1.3 Reagentes

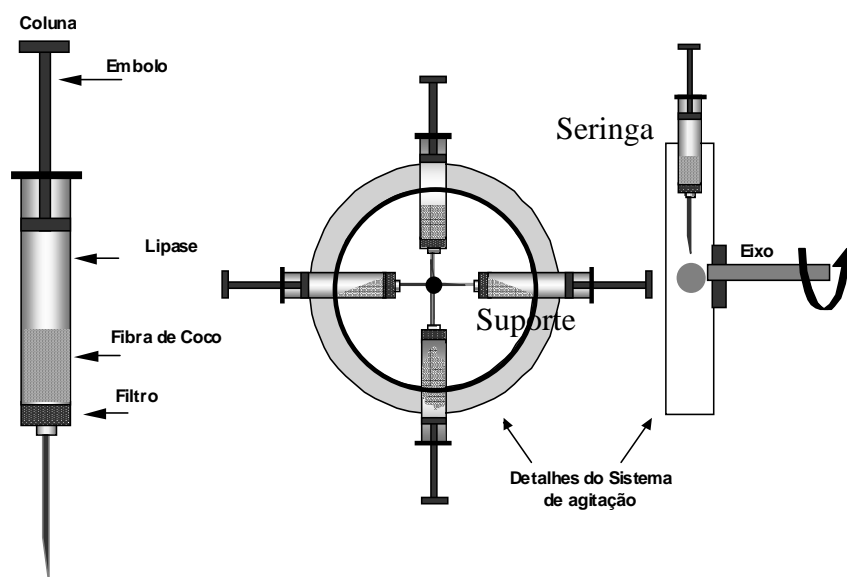
Para as reações de síntese e hidrólise foram utilizados: butirato de metila (Aldrich Chemical Co), n-butanol (Vetec) e ácido butírico (Vetec). Para determinação de proteína utilizou-se soro albumina bovina (Merck) como padrão, azul de Coomassie brilhante G-250 (Vetec), álcool etílico P.A. (Synth) e ácido orto-fosfórico P.A. (Vetec). 3-Glicidoxipropil trimetoxisilano (Aldrich Chemical Co) foi utilizado como agente funcionalizante na imobilização por ligação covalente. Outros reagentes também foram utilizados como: n-heptano P.A. (Vetec), hexano P.A. (Synth), fosfato de sódio monobásico P.A. (Vetec), fosfato de sódio dibásico P.A. (Vetec), hidróxido



de sódio P.A. (Vetec), dodecil sulfato de sódio (Amersham Pharmacia Biotech) – gentilmente cedido pelo Departamento de Bioquímica da UFC por intermédio da Pesquisadora Laura M. Bruno, periodato de sódio P.A. (Vetec), biftalato de potássio P.A. (Vetec), boro-hidreto de sódio (Vetec), fenolftaleína P.A. (Vetec), ácido nítrico P.A. (Reagen), ácido sulfúrico P.A. (ACS), dentre outros reagentes, todos de grau analítico e de marcas diversas.

### 3.1.4 Equipamentos

Para acompanhar a reação de hidrólise de butirato de metila, utilizou-se um titulador automático (titoprocessador da METROHM - Titrand 751). O espectrofotômetro (Spectronic® 20 Genesys) foi utilizado para determinação de proteína. Nos processos de imobilização, fez-se uso de sistema de agitação rotatório (Figura 3.2). Outros equipamentos também foram utilizados como: mesa agitadora (modelo TE420 – TECNAL), balança analítica digital (modelo ADA 210/L – ADAM), agitador magnético (modelo Q-221-2 – QUIMIS), agitador-aquecedor (Modelo 258 – FANEM), agitador de tubos tipo vortex (modelo AP56 – Phoenix), agitador de hélice eletrônico (modelo Q-235-2 – QUIMIS), conjunto de peneiras (Granutest), medidor de pH (modelo B375 – MICRONAL) e banho-maria (modelo BM003 – EQUA).



**Figura 3.2:** Esquema do aparato utilizado nos ensaios de imobilização (VEREDAS, 2000).

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Atividade Hidrolítica

São várias as metodologias utilizadas para se determinar a atividade hidrolítica de lipases (TSUJITA *et al.*, 1984; GELUK *et al.*, 1992; MARTINELLE, HOLMQUIST e HULT, 1995; PENCREAC'H e BARATTI, 1996; SECUNDO e CARREA, 2002). Dentre as mais utilizadas podemos citar a titulação de ácidos graxos liberados pela hidrólise de triglicerídio butírico (PLOU *et al.*, 1996; MUSIDLOWSKA-PERSSON e BORNSCHEUER, 2003), ou de óleos insaturados de cadeias longas, como óleo de oliva e de girassol (RAHMAN *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2004; SZCZESNA-ANTEZAK *et al.*, 2002). Alguns trabalhos referenciam o uso de butirato de metila como substrato para determinação de atividade hidrolítica (BASTIDA *et al.*, 1998; TSUJITA *et al.*, 1984). FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.* (1998) e RODRIGUES (2005) utilizaram o butirato de metila para medir a atividade hidrolítica da lipase tipo B de *Candida antarctica*, sendo a reação de hidrólise (Figura 3.3) acompanhada pela determinação do ácido butírico formado.



**Figura 3.3:** Reação de hidrólise do butirato de metila

No presente trabalho, a reação de hidrólise de butirato de metila 1% (v/v) catalisada pela enzima livre ou imobilizada ocorreu em tampão fosfato de sódio a 25 mM e pH 7, sob agitação, à temperatura ambiente (Rodrigues, 2005). Em 30 mL de substrato, adicionaram-se 0,1 mL de solução da enzima livre ou 0,1 g de derivado (fibra-lipase) e, através de titulação com hidróxido de sódio 0,05 M, monitorou-se a quantidade de produto formado durante 10 minutos. A titulação ocorreu em um titulador automático (titoprocessador) da METROHM operando no modo STAT com valor fixo de pH igual a 7. Considerando que a relação entre o número de moles de ácido butírico formado é equivalente à quantidade de hidróxido de sódio consumido para neutralizá-lo, o número de moles de ácido formado pôde ser calculado pela Equação 3.1:

$$n_{\text{Ácido}} = n_{\text{Hidróxido}} = V_{\text{NaOH}} * M_{\text{NaOH}} \quad (3.1)$$

sendo:

$n_{\text{Ácido}}$  o número de moles de ácido butírico;

$n_{\text{Hidróxido}}$  o número de moles de hidróxido de sódio;

$V_{\text{NaOH}}$  o volume de hidróxido de sódio consumido na titulação (L) e

$M_{\text{NaOH}}$  a molaridade do hidróxido de sódio.

Neste trabalho, uma unidade (U) de atividade enzimática hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico por minuto nas condições propostas.

A atividade recuperada ( $At_{\text{recuperada}}$ ) e o rendimento de imobilização ( $R$ ) foram calculados, respectivamente, a partir das equações 3.2 e 3.3:

$$At_{\text{recuperada}} = \frac{At_d}{At_0 - At_f} * 100 \quad (3.2)$$

$$R(\%) = \frac{At_0 - At_f}{At_0} * 100 \quad (3.3)$$

sendo:

$At_d$  a atividade hidrolítica no derivado (U);

$At_0$  a atividade hidrolítica na solução inicial de enzima (U) e

$At_f$  a atividade hidrolítica no sobrenadante após um dado período de imobilização (U).

### 3.2.2 Reação de Síntese de Butirato de n-Butila

A maioria das medidas de atividades de lipases é determinada a partir de reações de hidrólise. Contudo, considerando que elas também são capazes de realizar a reação inversa, e que não há uma relação direta entre a atividade de hidrólise e de síntese, muitos trabalhos têm referenciado algumas reações para determinação da atividade de síntese ou atividade de esterificação (GARCIA *et al.*, 1999; CASTRO, OLIVEIRA e PEREIRA, 2000; KIRAN *et al.*, 2000; SALIS *et al.*, 2004; ADAMCZAK, BORNSCHEUER e BEDNARSKI, 2005).

A fim de avaliar o potencial catalítico do derivado obtido em meio orgânico, selecionou-se a síntese de butirato de butila a partir da esterificação do ácido butírico com n-butanol (CASTRO, OLIVEIRA e SOARES, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2000; BRUNO *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2004). A síntese de butirato de butila foi realizada adicionando-se 0,3 g de enzima imobilizada e 1 g de peneira molecular

(zeólita 4A) a 20 mL de uma solução de ácido butírico e n-butanol, na proporção 1:1 (v/v), mantendo o sistema reacional hermeticamente fechado, sob agitação (150 rpm) por um dado período. O derivado utilizado nos estudos de adaptação metodológica foi obtido a partir da imobilização de CAL B – L2 (40 U/mL) em fibra de coco por adsorção (2 horas de contato). A presença de peneira molecular, um agente dessecante, tem como objetivo reduzir, ou mesmo evitar, a hidrólise parcial do éster formado devido à presença de água no meio reacional (CASTRO, OLIVEIRA e SOARES, 1997). Quanto ao solvente utilizado, optou-se pelo heptano devido a alguns fatores, tais como: hidrofobicidade ( $\log P_{\text{oct}}^3 = 4,0$ ), baixa toxicidade, ponto de ebulição igual a 98°C e elevada biocompatibilidade em alguns sistemas de esterificação já estudados (CASTRO, OLIVEIRA e SOARES, 1997; CHEN, 1996). A conversão foi calculada pelo decréscimo da concentração de ácido butírico na reação, ver Equação 3.4. Para calcular a atividade de síntese do derivado em estudo, determinou-se a quantidade de ácido presente após um dado tempo de reação (Equação 3.5). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consumiu 1  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico por minuto nas condições propostas.

$$\text{Conversão de ácido butírico (\%)} = \frac{Ca_0 - Ca_f}{Ca_0} * 100 \quad (3.4)$$

sendo  $Ca_0$  e  $Ca_f$ , respectivamente, a concentração inicial e final de ácido butírico presentes no meio reacional;

$$\text{Atividade de síntese (U/g)} = \frac{n^{\circ}mol * 10^6}{t * M_{der}} \quad (3.5)$$

sendo:

$n^{\circ}mol$  o número de moles de ácido butírico consumidos;

$t$  o tempo, em minutos, de reação até a retirada da amostra e

$M_{der}$  a massa do derivado em grama.

<sup>3</sup>  $\log P_{\text{oct}}$  de um dado solvente é o coeficiente de partição deste no sistema bifásico octanol-água. Solventes apolares possuem valores de  $\log P_{\text{oct}}$  maior que quatro. Segundo Laane *et al.* (1987) citado por Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004), os solventes com  $\log P_{\text{oct}} \leq 2$  são hidrofílicos e não são adequados para a biocatálise porque perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando-o ou desnaturando-o. Os solventes que possuem  $\log P_{\text{oct}}$  entre 2 e 4 são menos hidrofílicos, perturbam fracamente a interação água-biocatalisador e afetam a estrutura das enzimas de maneira imprevisível. Quanto aos solventes que possuem  $\log P_{\text{oct}}$  superior a 4, estes são hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, deixando o biocatalisador no seu estado ativo.

A quantidade de ácido butírico presente no sistema foi determinada por titulação. Retirou-se uma alíquota de 1 mL do meio reacional, que foi adicionada a 10 mL de uma solução 1:1 de etanol e água. Posteriormente, adicionaram-se 3 gotas de solução etanólica de fenolftaleína 1% (v/v) à mistura e titulou-se o ácido butírico presente com NaOH 20 mM. A partir do volume de NaOH consumido, considerando que a relação entre o número de moles de ácido butírico presentes no sistema é equivalente à quantidade de hidróxido de sódio consumido para neutralizá-lo (Equação 3.1), pôde-se determinar a concentração de ácido butírico presente no meio reacional (Equação 3.6) antes e após a reação de síntese.

$$C_{\text{Ácido}} = \frac{n_{\text{Ácido}}}{V_{\text{Amostra}}} \quad (3.6)$$

### 3.2.3 Determinação do Teor de Proteína

Para determinação do teor de proteína presente nas soluções de lipase, utilizou-se uma adaptação do método sugerido por Bradford (1976) que é uma técnica bastante conhecida e utilizada para quantificação de proteína. A metodologia baseia-se no princípio de formação de um complexo entre a proteína e o azul de Coomassie brilhante. O Coomassie se apresenta em duas formas diferentes, vermelha e azul. A forma vermelha é convertida para a forma azul através da formação do complexo pigmento-proteína. Este processo de ligação é rápido, aproximadamente 2 minutos, e o complexo formado permanece disperso em solução por, aproximadamente, 1 hora. Assim, a concentração de proteína está diretamente relacionada à intensidade da cor azul na solução, observada em espectrofotômetro.

O reagente de Bradford foi preparado a partir da dissolução de 100 mg de azul de Coomassie em 50 mL de etanol 95% e posterior adição de 100 mL de ácido orto-fosfórico 85% (p/v). A solução final foi diluída com água destilada para um volume final de 1 L.

Em um tubo de ensaio, adicionaram-se 3 mL do reagente de Bradford a 0,3 mL da amostra, agitou-se o tubo em agitador vortex e esperou-se por 2 minutos para realizar a leitura de absorvância ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ) em espectrofotômetro. Para obtenção da curva de calibração de proteína, correlacionaram-se valores de absorvância obtidos a partir da leitura de soluções de soro albumina bovina a concentrações

---

conhecidas de proteína, variando-se a concentração entre 0 e 100 µg de proteína/mL.

### **3.2.4 Imobilização por Adsorção**

#### **3.2.4.1 Pré-tratamento da fibra**

A fibra de coco obtida a partir do processamento descrito anteriormente (Figura 3.1) possui pó de coco, sais, além de outras impurezas. Tais impurezas, além de ocupar parte da área superficial destinada à imobilização de enzimas, podem influenciar no processo de imobilização. Assim, objetivando avaliar a influência de tais impurezas no processo de imobilização, realizaram-se testes utilizando fibra na forma bruta, lavada com água e lavada com água e dodecil sulfato de sódio (SDS).

A lavagem com água destilada ocorreu na proporção mássica fibra/água de 1:100, em 5 ciclos. Parte da fibra lavada com água (1 g) foi separada e submetida a um banho em água quente (100°C) contendo 0,01% (p/v) de SDS (25 mL) por uma hora (DEY, NAGPAL e BANERJEE, 2002), para provocar a dessorção de qualquer proteína naturalmente adsorvida na fibra. Após a lavagem, as fibras foram secas em estufa.

Para avaliar as três formas de fibras (bruta, lavada com água e lavada com dodecil sulfato de sódio), imobilizou-se lipase por adsorção a partir de uma solução de CAL B – L1 (68 U/mL) a qual permaneceu em contato com o suporte sob rotação, a temperatura ambiente, por duas horas. As atividades de hidrólise do derivado e do sobrenadante foram medidas e a atividade recuperada e o rendimento de imobilização calculados.

#### **3.2.4.2 Técnica de imobilização por adsorção**

A imobilização da lipase por adsorção física ocorreu à temperatura ambiente, por períodos de tempos definidos, fazendo-se uso da técnica de banho finito. O banho finito foi implementado através de um sistema reparticionado em seringas de 5 mL, mantido sob rotação (Figura 3.2). Para cada grama de fibra, utilizaram-se 10 mL de solução de lipase em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7. Após adsorção, separou-se o sobrenadante do derivado por filtração, que foi submetido à

---

lavagem com 10 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, e secagem a vácuo por 10 minutos.

A fim de avaliar o processo de imobilização, quantificou-se a atividade hidrolítica da solução de enzima oferecida ao suporte (tempo zero), do sobrenadante ao final do processo de imobilização e do derivado obtido. A partir destes resultados foi possível calcular a atividade recuperada (Equação 3.2) e o rendimento de imobilização (Equação 3.3). O tempo de contato para que a adsorção ocorresse foi determinado a partir de estudos cinéticos de adsorção (item 3.2.4.3).

#### 3.2.4.3 Influência da concentração de enzima e do tempo de adsorção na imobilização

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte dependem de vários parâmetros, tais como, tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, porosidade e tamanho dos poros. A eficiência depende também da concentração de enzima oferecida. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação para uma dada temperatura (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). O estudo da formação desse patamar, bem como do processo de adsorção com o tempo é o que chamamos de equilíbrio e cinética de adsorção, respectivamente.

Com o intuito de observar a influência da concentração inicial de enzima na imobilização de lipase por adsorção em fibra de coco verde, calculou-se a atividade recuperada e o rendimento da imobilização a partir de soluções de CAL B – L1 contendo 30, 60 e 90 U/mL. Em paralelo, para cada concentração de enzima avaliada, realizou-se o estudo cinético de adsorção para o sistema fibra-lipase. Para tanto, o processo de adsorção foi monitorado através da atividade hidrolítica no sobrenadante e no derivado, durante 24 horas. Análise da quantidade de proteína oferecida e não adsorvida também foi realizada tanto para os estudos de cinética quanto de equilíbrio. Quando possível, a quantidade de proteína adsorvida foi calculada pela equação:

$$P_{ads} = \frac{(P_o - P_{sob}) * V}{m_{fibra}} \quad (3.7)$$

sendo:

$P_{ads}$  a quantidade de proteína adsorvida por grama de fibra ( $\mu\text{g/g}$ );

$P_o$  a quantidade de proteína oferecida para adsorção ( $\mu\text{g/mL}$ );

$P_{sob}$  a quantidade de proteína não adsorvida ( $\mu\text{g/mL}$ );

$V$  o volume de solução de lipase utilizado para imobilização (mL) e

$m_{fibra}$  a massa de fibra utilizada para imobilização (g).

#### 3.2.4.4 Influência do pH do meio no processo de imobilização

Dentre os fatores que influenciam no processo de imobilização, ressaltam-se: pH do meio, temperatura, concentração de enzima e presença de aditivos. O pH do meio de imobilização modifica as interações entre grupos de carga elétrica ou dipolo presentes na enzima e no suporte, o que influencia na afinidade entre eles (GELUK *et al.*, 1992).

A fim de se avaliar a influência do pH do meio reacional no processo de imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco verde, realizou-se imobilização por adsorção partindo de uma solução de CAL B – L2 (40 U/mL) em tampão fosfato 25 mM, sendo o tempo de contato de 2 horas. O pH do meio dispersante variou entre 3 e 10. As atividades hidrolíticas da solução de enzima antes e após a imobilização (sobrenadante) e do derivado obtido foram determinadas. A partir destes resultados calculou-se a atividade recuperada (Equação 3.2) e o rendimento de imobilização (Equação 3.3). A quantidade de proteína adsorvida (Equação 3.7) também foi calculada.

#### 3.2.4.5 Influência do pH da fibra

O valor do pH da superfície de um dado suporte pode influenciar tanto o processo de imobilização, considerando as forças iônicas de imobilização, quanto os resultados de reações de síntese, devido às migrações dos grupamentos acilas. Sabe-se que superfícies carregadas afetam a migração dos grupamentos acilas, influenciando na catálise de reações de síntese, o que não ocorre em superfícies com pH neutro (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Em face deste panorama, avaliou-se o



---

uso de fibra neutralizada tanto no processo de imobilização quanto na reação de síntese de butirato de n-butila.

Neutralizou-se a fibra de coco, lavada com água, através do contato com uma solução de NaOH 0,1 M. A cada 1 g de fibra, adicionaram-se 10 mL de solução de NaOH 0,1 M e deixou-se sob agitação por um período de 30 minutos, a temperatura ambiente. Após este tempo, a fibra foi lavada exaustivamente com água destilada até que o pH da superfície da mesma atingisse o valor 7. As fibras neutralizadas foram submetidas à secagem em estufa a 60°C. A fim de determinar o valor de pH na superfície da fibra, pesou-se 0,1 g de fibra, que foi umedecida com água destilada e, em seguida, comprimiu-se sobre a mesma uma fita de papel indicador de pH por um período de 2 minutos. Após o contato, avaliou-se o valor de pH obtido comparando as cores presentes na fita com as cores definidas como padrões para valores distintos de pH na tabela fornecida pelo fabricante do papel. Estudou-se o processo de imobilização por adsorção tanto na fibra não neutralizada quanto na fibra neutralizada, utilizando-se uma solução de CAL B – L2 (40 U/mL) que permaneceu em contato com a fibra por um período de 2 horas. Valores de atividade hidrolítica da solução inicial, do sobrenadante e do derivado foram determinados e, a atividade recuperada (Equação 3.2) e o rendimento de imobilização (Equação 3.3), calculados. Avaliou-se também a atividade de esterificação e conversão de ácido butírico (Equação 3.4), na síntese de butirato de butila catalisada pelo.

#### 3.2.4.6 Efeito da concentração de butirato de metila na atividade de lipase solúvel e imobilizada

A forma mais simples de estudar a velocidade de uma dada reação catalisada por enzimas, bem como a influência da concentração de substrato, é considerar que ela obedece o mecanismo proposto por Michaelis-Menten (LEHNINGER, 1970), ver Equação 3.8.

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \quad (3.8)$$

em que:

$K_m$  é a constante de Michaelis-Menten expressa em unidades de concentração (moles/litro);

$V_{m\acute{a}x}$  é a velocidade máxima na concentração de saturação do substrato.

Para a obtenção de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  de forma mais simplificada, frente à ausência de recursos computacionais no início dos estudos de biocatálise, alguns métodos de análise linear foram sugeridos. Dentre os mais tradicionais, encontra-se o gráfico de Lineweaver-Burk, o qual é obtido relacionando-se o inverso da velocidade de reação ( $1/V_0$ ) com o inverso da concentração de substrato ( $1/S_0$ ), ver Equação 3.9.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3.9)$$

A reta obtida pelo método de Lineweaver-Burk nada mais é do que a equação de Michaelis – Menten linearizada. Assim, com a equação da reta obtida, é possível determinar os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ . Este método possui a desvantagem de que pequenos erros na obtenção da velocidade inicial ( $V_0$ ), para baixas concentrações de substrato, são transformados em grandes erros, já que se trabalha com o inverso de  $V_0$ , influenciando a inclinação da reta e originando grandes erros nos valores de  $K_m$  e de  $V_{m\acute{a}x}$ . Contudo, com o desenvolvimento de métodos numéricos, como o de Levenberg Marquardt, passou-se a determinar os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  pelo ajuste não-linear do modelo aos pontos experimentais e, desta forma, eliminou-se o erro do ajuste devido às baixas concentrações de substrato. Neste caso, estão presentes erros experimentais, provenientes da execução da metodologia utilizada para obtenção dos pontos, e erros do ajuste do modelo (SHULER e KARGI, 1992).

Em paralelo, o processo de imobilização, além de garantir o reuso, pode promover maior afinidade da enzima ao substrato. Para observação de tal fenômeno, faz-se necessário avaliar a influência da concentração inicial de substrato no meio reacional tanto para a enzima livre quanto para a enzima imobilizada (BASTIDA *et al.*, 1998). Neste intuito, estudou-se a velocidade da reação de hidrólise de butirato de metila, em pH 7 e temperatura ambiente, em função da concentração de substrato, que variou entre 25 e 150 mM, catalisada por lipase livre (100  $\mu$ L de solução de CAL B – L1 com 30 U/mL) ou imobilizada (0,1 g de derivado contendo aproximadamente 32 U/g). Neste trabalho, os ajustes lineares e não lineares foram realizados utilizando o software Origin versão 6.0.

### 3.2.5 Imobilização por Ligação Covalente

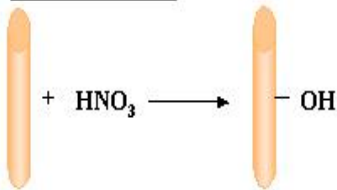
#### 3.2.5.1 Funcionalização da fibra

Celulose ou materiais celulósicos funcionalizados possuem aplicações na área biológica (anticogulantes, imobilização de enzimas, etc), química (remoção de metais pesados, pré-concentração de traços de elementos, etc) e física (transferência catalítica de elétrons, retardantes de chamas, etc). São inúmeras as metodologias para a funcionalização, estando a escolha ligada à aplicação do material funcionalizado (HEINZE e LIEBERT, 2001). Em paralelo, estão disponíveis na literatura referências sobre o uso de agentes funcionalizados a base de silano, como  $\gamma$ -aminopropiltriétoxissilano (APTS), hexadeciltrimetoxissilano (HDS) e 3-glicidoxipropil trimetoxissilano (GPTMS), na modificação de superfícies, inclusive de fibras celulósicas (ABDELMOULEH *et al.*, 2004; ESTEVES, BARROS-TIMMONS e TRINDADE, 2004). Superfícies funcionalizadas com GPTMS ou APTS também têm sido usadas como suportes para imobilização de enzimas por ligação covalente (PEREIRA, 1996; FERREIRA *et al.*, 2003). Assim, selecionou-se o GPTMS como agente funcionalizante, sendo o processo de funcionalização de fibra de casca de coco verde, ver Figura 3.4, realizado conforme metodologia desenvolvida por Pereira (1996). Contudo, considerando a baixa área superficial da fibra, avaliaram-se duas concentrações de solução aquosa de GPTMS, 1 e 5% (v/v), com o objetivo de verificar a variação da densidade de grupamentos aldeídos no suporte funcionalizado.

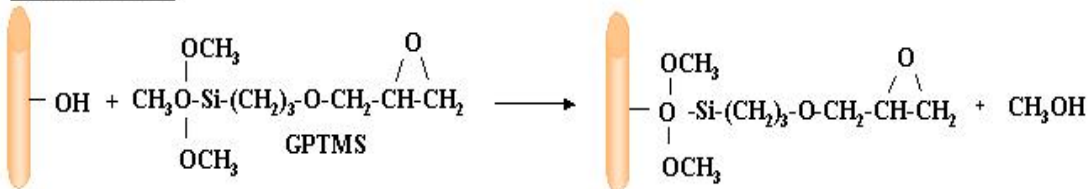
A funcionalização iniciou-se através da protonação da fibra, etapa necessária para ativar os grupos hidroxilas que irão reagir com o GPTMS. Para tanto, 30 mL de solução de ácido nítrico a 10% (v/v) foram colocados em contato com 1 g de fibra lavada com água, a 30°C, durante 30 minutos, sob agitação. Em seguida, realizou-se uma seqüência de lavagens da fibra com ácido nítrico a 10% (v/v) e soluções aquosas de acetona a 20%, 50% e 100% (v/v), respectivamente, utilizando-se 30 mL de cada solução para a lavagem. Após a lavagem, a fibra foi submetida à secagem em estufa a 60°C por 1 hora. A seguir, realizou-se a reação de silanização submergindo a fibra em 30 mL de solução aquosa de GPTMS a pH 8,5 (corrigido com solução de KOH para evitar a formação de precipitados de GPTMS), por um período de 5 horas a 60°C, sob agitação. Ao final da silanização, o suporte foi lavado com água destilada e soluções aquosas de acetona a 20%, 50% e 100% (v/v),

respectivamente, e submetido à secagem em estufa a 60°C por 1 hora. A fibra silanizada e seca foi submetida a tratamento com 30 mL de ácido sulfúrico 100 mM durante 2 horas a 85°C, sob agitação, para a hidrólise dos grupos epóxidos. Após esta etapa, repetiu-se o processo de lavagem com água e soluções aquosas de acetona seguido de secagem em estufa a 60°C por 1 hora.

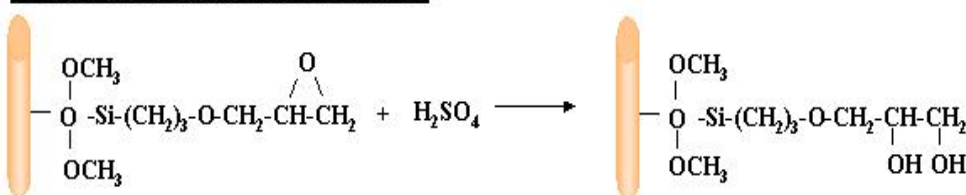
**Protonação:**



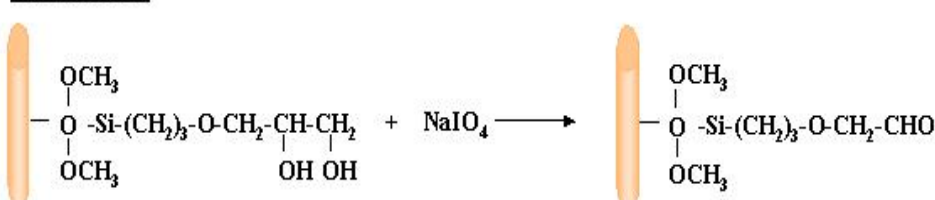
**Silanização:**



**Hidrólise dos grupos epóxidos:**



**Oxidação:**



**Figura 3.4:** Processo de funcionalização da fibra de casca de coco verde com 3-glicidoxipropil trimetoxissilano (GPTMS).

A etapa final da funcionalização é a formação de terminações aldeídicas, através das quais as enzimas, portadoras de grupos amins, ligar-se-ão ao suporte, formando bases de Schiff. Desta feita, realizou-se a oxidação do suporte, através da adição de forma gradual e lenta de 5 mL de solução 40 mM de periodato de sódio ao suporte. A oxidação ocorreu à temperatura ambiente durante o período de uma hora. Alíquotas de 100 µL da solução de periodato foram extraídas, após 30 e 60 minutos de contato com o suporte, para se realizar o controle da oxidação. Ao final da

oxidação, a fibra funcionalizada foi lavada exaustivamente com água, para impedir que qualquer resíduo de solução de periodato permanecesse no suporte. Em seguida, o suporte foi lavado com 30 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM, pH7, e submetido a secagem a vácuo, após a qual a fibra foi armazenada em recipiente hermeticamente fechado.

A quantificação dos grupamentos aldeídos disponíveis para ligação covalente permite um maior controle do grau de ativação do suporte. A quantificação baseia-se na redução do periodato de sódio durante a oxidação. Para acompanhar tal redução, fez-se uso da reação do iodeto de potássio (quando em excesso) com periodato formando iodo, ver Equação 3.10.



O iodo presente na solução promove a formação de uma coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à sua concentração no meio, tornando possível a quantificação do iodo formado através da absorção de luz visível em espectrofotômetro. Para realizar a quantificação, inicialmente, preparou-se a solução A, fonte de iodeto de potássio, a partir da mistura de uma solução saturada de bicarbonato de sódio com uma solução de iodeto de potássio 10% (m/v), na proporção 1:1. Zerou-se o espectrofotômetro com uma amostra formada a partir da adição de 100 µL de água a 3 mL da solução A. Preparou-se uma amostra padrão, 100 µL da solução de periodato de sódio mais 3 mL da solução A, e selecionou-se o comprimento de onda ( $\lambda$ ) no qual a absorbância se aproximou de 0,7. Com os valores de  $\lambda$  e de absorbância da amostra padrão estabelecidos, adicionaram-se 3 mL de solução A a cada amostra do meio reacional (100 µL), coletadas no tempo de 30 e 60 minutos, e realizou-se a leitura de absorbância. A quantidade de grupos aldeídos presentes no suporte foi calculado a partir das Equações 3.11 e 3.12:

$$G_A Si = \frac{Abs_{Amostra} \times G_A So}{Abs_{Padrão}} \quad (3.11)$$

$$G_A Su = 200 - G_A Si \quad (3.12)$$

sendo:

$G_A So$  a quantidade de periodato inicialmente disponível no meio reacional para cada 1 g de fibra funcionalizada (µmol);

---

$Abs_{Amostra}$  o valor de absorvância da amostra, para o  $\lambda$  definido;

$Abs_{Padrão}$  o valor de absorvância próximo a 0,7, lido durante a definição do  $\lambda$ ;

$G_A Si$  a quantidade de periodato presente no meio reacional após um dado tempo de contato com a fibra ( $\mu\text{mol}$ ) e

$G_A Su$  a quantidade de grupos aldeídos presentes em 1 g de suporte ( $\mu\text{mol}$ ).

### 3.2.5.2 Pré-tratamento do suporte com hexano

O pré-tratamento do suporte, antes ou após a imobilização, com uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos/água (ou tampão) no processo de imobilização de lipases tem se mostrado eficiente em alguns casos, proporcionando a obtenção de um derivado mais ativo (FORESTI e FERREIRA, 2005).

O pré-tratamento com hexano – selecionado por ser considerado um bom solvente orgânico para preservar a atividade de lipases (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998) – foi avaliado quando realizado antes, durante e após o processo de imobilização de lipase em fibra funcionalizada com GPTMS. Como parâmetros de análise do efeito do pré-tratamento com hexano, selecionaram-se as medidas de atividade hidrolítica e de síntese do derivado obtido (Equação 3.5), atividade recuperada (Equação 3.2) e o rendimento de imobilização (Equação 3.3). O procedimento realizado para o estudo do tratamento do suporte, antes e durante a imobilização, foi baseado na metodologia proposta por Castro, Lima e Roberto (2001).

#### a) Pré-tratamento do suporte antes do processo de imobilização:

Para cada 2 g de fibra previamente funcionalizada com GPTMS, adicionaram-se 10 mL de hexano e manteve-se a mistura sob repouso por 2 horas. Após este período, descartou-se o hexano em excesso. A fibra pré-tratada foi colocada em contato com 9 mL de solução de CAL B – L2 em tampão fosfato pH 7 (40 U/mL) e 200  $\mu\text{L}$  de solução de 5 mg/mL de polietilenoglicol (PEG 6.000), a temperatura ambiente, sob agitação, por 2 horas. Após este período, o derivado foi filtrado, lavado com tampão fosfato e submetido à secagem a vácuo. Para efeitos comparativos, realizou-se imobilização conforme descrito acima em fibra funcionalizada com GPTMS sem tratá-la com hexano.

b) Pré-tratamento do suporte durante o processo de imobilização:

Inicialmente, seguiu a metodologia descrita acima no item a. Ao fim das duas horas de contato, adicionaram-se 10 mL de hexano ao meio e a mistura permaneceu por 15 horas a 8°C, sob agitação. Por fim, o derivado foi filtrado e lavado com hexano. Após a lavagem, realizou-se a secagem a temperatura ambiente por um período de 1 hora.

c) Pré-tratamento do suporte após o processo de imobilização:

Para avaliar o efeito do tratamento com hexano após a imobilização, realizou-se imobilização de CAL B – L2 (40 U/mL) em fibra funcionalizada e, ao fim da imobilização, o derivado foi submetido à lavagem com solução tampão fosfato a pH 7 e secagem a vácuo. O derivado seco foi lavado com hexano (10 mL) e seco à temperatura ambiente por um período de 1 hora.

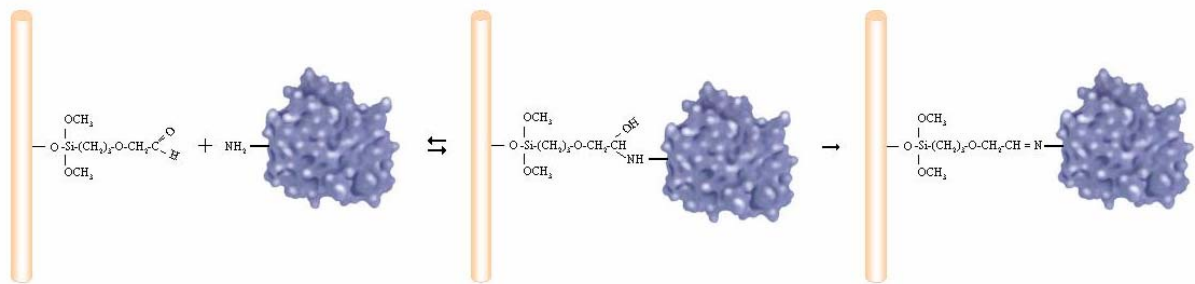
### 3.2.5.3 Efeito da concentração inicial de enzima

Com o objetivo de avaliar a carga máxima de enzima que poderia ser imobilizada na fibra por ligação covalente, variou-se a concentração inicial de enzima no sobrenadante entre 40 e 550 U/mL. A imobilização ocorreu à temperatura ambiente, utilizando seringas de 5 mL, mantidas sob rotação (Figura 3.2), por um período de 2 horas. Para cada grama de fibra, utilizaram-se 10 mL de solução de CAL B – L2 em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7. Após a imobilização, separou-se o sobrenadante do derivado, que foi submetido à lavagem com 10 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, e secagem a vácuo por 10 minutos. A atividade hidrolítica da solução de enzima antes e após a imobilização, bem como a do derivado foram determinadas para posterior cálculo da atividade recuperada (Equação 3.2) e do rendimento de imobilização (Equação 3.3).

### 3.2.5.4 Influência do pH de imobilização nas propriedades do biocatalisador

A imobilização de enzimas em suportes funcionalizados com compostos organossilânicos, como é o caso do GPTMS, dá-se através da reação entre os grupos aldeído presentes no suporte e os grupos amina presentes nas enzimas, formando como ponte entre enzima e suporte uma base de Schiff, ver Figura 3.5. As enzimas,

apesar de apresentarem vários grupos aminos disponíveis, quando em soluções a pH 7, possuem raros grupos aminos não protonadas, que são os únicos capazes de produzir um ataque nucleofílico contra os grupos aldeídos do suporte. Isto ocorre porque boa parte desses grupos aminos, resíduos de lisina, possuem  $pK_a$  em torno de 10,5, mostrando baixa reatividade a pH 7. Logo, devido às raras ligações covalentes formadas, considera-se que a imobilização se processa de forma unipontual quando realizada a pH 7 (BLANCO, CALVETE e GUIÁN, 1989; MATEO *et al.*, 2000). Uma forma de favorecer as ligações dos grupos aminos da enzima aos grupos aldeídos do suporte, aumentando as ligações multipontuais, é realizar o processo de imobilização por ligação covalente a pH 10 (OTERO, BALLESTEROS e GUIÁN, 1988).



**Figura 3.5:** Reação entre grupos aldeídos (suporte) e aminos (enzima) para formação do complexo suporte-enzima

Desta forma, a fim de avaliar o processo de imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco por ligação covalente, estudaram-se variáveis como tempo de imobilização, concentração de enzima, presença de aditivos e uso de borohidreto de sódio como agente redutor, tanto para derivados obtidos a pH 7 quanto a pH 10. A partir deste estudo, foi possível definir o melhor protocolo de imobilização de CAL B em fibra de coco funcionalizada com GPTMS.

O processo de imobilização de CAL B em fibra funcionalizada, realizado durante os estudos das variáveis citadas acima, ocorreu à temperatura ambiente, em seringas de 5 mL, mantidas sob rotação (Figura 3.2). Para cada grama de fibra, utilizaram-se 10 mL de solução de CAL B – L2 em tampão adequado (tampão fosfato de sódio 25 mM para imobilização a pH 7 e tampão bicarbonato de sódio 200 mM para imobilização a pH 10). Após a imobilização, separou-se o sobrenadante do derivado, o qual foi submetido à lavagem com 10 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, e à secagem a vácuo por 10 minutos.



---

a) Influência do tempo de contato enzima-suporte

Considerando que a imobilização por ligação covalente requer a ocorrência de uma reação, acompanhou-se o processo de imobilização de CAL B – L2 (40 U/mL para pH 7 e 80 U/mL para pH 10) em fibra funcionalizada com o intuito de se avaliar o tempo necessário para uma melhor imobilização. Este tempo foi definido através da atividade do derivado, da atividade recuperada (Equação 3.2), do rendimento de imobilização (Equação 3.3) e da quantidade de proteína imobilizada nos diferentes tempos de contato, tanto para imobilização a pH 7 quanto a pH 10.

b) Efeito da presença de aditivos no processo de imobilização

O uso de aditivos no processo de imobilização tem como principais objetivos proteger a enzima de inativação durante a etapa de imobilização, reter a camada de água em torno da lipase ou mesmo provocar um efeito dispersante das moléculas de enzimas, facilitando o transporte de massa (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998). Alguns trabalhos referenciam o uso do PEG como aditivo no processo de imobilização de lipase com resultados satisfatórios (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998; VILLENEUVE *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2003). Em paralelo, a presença de um agente de proteção (substrato ou inibidor) durante a imobilização multipontual pode exercer efeitos sobre a atividade, estabilidade e especificidade da enzima imobilizada, além de, em alguns casos, proteger o sítio ativo do efeito de desnaturação provocado pelo uso de agentes redutores de base de Schiff (BLANCO e GUIÁN, 1989). Portanto, buscou-se avaliar o efeito da presença de PEG e de ácido butírico no processo de imobilização de CAL B em fibra de coco por ligação covalente.

Para avaliar a influência do uso de aditivos bem como da concentração de enzima no processo de imobilização de lipase por ligação covalente a pH 7 e pH 10, adotou-se a metodologia do planejamento fatorial, sendo a escolha dos fatores e dos níveis baseada na literatura (CASTRO, LIMA e ROBERTO, 2001; RODRIGUES, 2005; BRÍGIDA *et al.*, 2005). A influência de três variáveis controle, concentração de lipase ( $X_1$ ), de PEG 6.000 ( $X_2$ ) e de ácido butírico ( $X_3$ ), foi estudada. Duas variáveis respostas: atividade hidrolítica no derivado ( $R_1$ ) e conversão de ácido butírico na esterificação ( $R_2$ ) foram utilizadas no planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2002). Os níveis das variáveis independentes encontram-se na Tabela 3.2. Todos os experimentos foram

executados de forma randômica. Dois experimentos foram realizados no ponto central, para estimativa da variância. A análise dos resultados foi realizada através dos cálculos do efeito estimado, do erro padrão e da distribuição de Student de cada variável controle sobre as variáveis respostas empregando o programa Statistica (versão 5.0), considerando o intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

As concentrações iniciais de enzima e ácido butírico no sobrenadante variaram de acordo com a Tabela 3.2, segundo o planejamento experimental a ser analisado (Tabela 3.3), sendo o tempo de contato enzima-suporte fixo e igual a 2 horas. No caso específico da variável PEG 6.000, para concentrações diferentes de zero, adicionaram-se 100  $\mu$ L de solução de PEG 6.000 para cada 5 mL de solução de lipase.

**Tabela 3.2:** Níveis das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial  $2^3$  para imobilização a pH 7 e 10.

Variáveis Independentes	Símbolo	Níveis		
		- 1	0	+ 1
Conc. Inicial de Enzima (U/mL)	$X_1$	40	60	80
PEG 6.000 (mg/mL)	$X_2$	0	2,5	5
Ácido Butírico (mM)	$X_3$	0	115	230

**Tabela 3.3:** Matriz de planejamento fatorial  $2^3$  para imobilização a pH 7 e pH 10 com os coeficientes de contrastes.

Ponto experimental	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	- 1	- 1	- 1
2	- 1	- 1	+ 1
3	- 1	+ 1	- 1
4	- 1	+ 1	+ 1
5	+ 1	- 1	- 1
6	+ 1	- 1	+ 1
7	+ 1	+ 1	- 1

**Tabela 3.3:** Matriz de planejamento fatorial  $2^3$  para imobilização a pH 7 e pH 10 com os coeficientes de contrastes (Continuação).

Ponto experimental	$X_1$	$X_2$	$X_3$
8	+ 1	+ 1	+ 1
9	0	0	0
10	0	0	0

c) Influência do uso de borohidreto de sódio como agente redutor das bases de Schiff após imobilização em fibra de coco verde funcionalizada com GPTMS

Considerando que os grupamentos aldeídos adicionados na fibra tendem a reagir reversivelmente com os grupamentos amina presentes na lipase formando iminas (bases de Schiff), faz-se necessário o uso de um agente, como o borohidreto de sódio, para reduzi-las a amins secundárias, tornando a ligação enzima-suporte mais estável. O borohidreto, além de agente redutor, é responsável por converter os grupos aldeídos remanescentes no suporte após a imobilização em hidroxilas inertes (BLANCO, CALVETE e GUIÁN, 1989). Contudo, tem-se observado que este reagente pode provocar o rompimento das pontes de dissulfeto ou a quebra das ligações peptídicas das enzimas, afetando drasticamente a atividade e/ou a estabilidade dos derivados (BLANCO e GUIÁN, 1989). Neste contexto, avaliou-se o uso de diferentes concentrações de borohidreto de sódio (0,5; 1; 2; 4 e 6 mg/mL) para redução das bases de Schiff formadas no processo de imobilização de CAL B em fibra funcionalizada com GPTMS.

Nestes experimentos, utilizaram-se beakers de 25 mL, nos quais a solução de enzima, em contato com o suporte, foi mantida sob agitação suave através de um agitador de hélice eletrônico, à temperatura ambiente. Para cada grama de fibra, utilizaram-se 10 mL de solução de CAL B – L2 (80 U/mL) em tampão fosfato 25 mM pH 7 ou em tampão bicarbonato 200 mM pH 10. Após 2 horas de contato fibra-enzima, adicionou-se uma massa conhecida de borohidreto, para alcançar, em solução, as diversas concentrações anteriormente citadas. A reação de redução das bases de Schiff foi realizada por 30 minutos. Ao fim da reação, separou-se a solução contendo borohidreto do derivado, o qual foi submetido à lavagem com solução tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7 em excesso, e secagem a vácuo por 10 minutos. Com o objetivo de avaliar o processo de imobilização e de redução das

---

bases de Schiff, quantificou-se a atividade hidrolítica da solução de enzima, antes e após a imobilização, e do derivado, antes e após a etapa de redução. Ensaio de estabilidade térmica a 60°C do derivado obtido também foram realizados.

d) Estabilidade à estocagem

A estabilidade à estocagem dos biocatalisadores preparados pela técnica de ligação covalente a pH 7 e pH 10 foi avaliada através do acompanhamento de sua atividade de hidrólise de butirato de metila, utilizando 0,3 g de derivado estocado. O derivado foi estocado sob refrigeração, embalado em papel de alumínio, logo após sua preparação e secagem a vácuo.

Alternativamente, avaliou-se a estocagem do derivado na presença de hexano. Neste caso, 0,3 g do derivado, ao invés de serem embalados em papel alumínio, foram submersos em 5 mL de hexano e estocados sob refrigeração.

### **3.2.6 Estabilidade Térmica e Operacional dos Derivados Obtidos**

Como foi destacado no capítulo 2 (item 2.1.2.5), a avaliação da estabilidade dos derivados obtidos durante estudos de imobilização é muito relevante, principalmente na prospecção de futuras aplicações industriais. Desta forma, fez-se necessário avaliar a estabilidade térmica e operacional dos derivados obtidos tanto por adsorção quanto por ligação covalente.

#### **3.2.6.1 Estabilidade operacional de hidrólise**

A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi realizada submetendo 0,4 g de derivado a subseqüentes ciclos reacionais de hidrólise de butirato de metila. Ao fim de cada batelada, o derivado foi filtrado, lavado com 10 mL de solução tampão fosfato 25 mM pH 7 e submetido à secagem a vácuo por 10 minutos.

#### **3.2.6.2 Estabilidade operacional de síntese**

A estabilidade operacional de síntese da lipase imobilizada foi realizada submetendo 0,3 g de derivado a vários ciclos reacionais de síntese de butirato de n-butila. Ao fim de cada ciclo, o derivado foi filtrado, lavado com 20 mL de hexano e mantido a temperatura ambiente por um período de uma hora para secagem do mesmo.

### 3.2.6.3 Estabilidade térmica

Uma solução de lipase livre, contendo 160 U/mL, ou 0,2 g de lipase imobilizada suspensa em 5 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7, foi submetida a incubação a 50 e/ou 60°C. A atividade enzimática de hidrólise no instante zero foi definida como sendo 100%. Em intervalos de tempo pré-determinados, a atividade enzimática hidrolítica foi medida e expressa em percentagens da atividade inicial. Com base no perfil de desativação térmica, calcularam-se as constantes de desativação térmica, o tempo de meia vida aparente e o fator de estabilização, sendo este último dado pela Equação 3.13.

$$\text{Fator de estabilização (F)} = \frac{t_{1/2}(E_I)}{t_{1/2}(E_S)} \quad (3.13)$$

sendo  $t_{1/2}(E_I)$  o tempo de meia vida aparente da enzima imobilizada e  $t_{1/2}(E_S)$  o tempo de meia vida aparente da enzima solúvel.

Para a obtenção das constantes de desativação térmica, utilizou-se o modelo proposto por Henley e Sadana (1985) citado por Arroyo, Sanchez-Montero e Sinisterra (1999) para a desativação térmica de enzimas com perfil de decaimento exponencial duplo. O modelo baseia-se na existência de três estados para a enzima estudada:



sendo  $k_1$  e  $k_2$  os coeficientes de desativação de primeira ordem. Considerando-se  $A$  como a atividade residual, em percentagem, tem-se que:

$$A = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + A_3 \quad (3.14)$$

e

$$A_1 = 100 + \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_2 - k_1} \quad (3.15)$$

$$A_2 = \frac{\alpha_2 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_1 k_1}{k_2 - k_1} \quad (3.16)$$

$$A_3 = \alpha_2 \quad (3.17)$$

sendo:

$\alpha_1$  a taxa de atividade específicas entre o estado  $E_1$  e o estado inicial  $E$  e

$\alpha_2$  a taxa de atividade específicas entre o estado  $E_2$  e o estado inicial  $E$ .

---

Como a atividade residual ( $A$ ) varia de 0 a 100, o tempo de meia vida aparente ( $t_{1/2}$ ) foi calculado pela Equação 3.14 considerando  $A = 50$ .

Quando se observou perfil de desativação tipo decaimento exponencial simples, a Equação 3.14 pôde ser simplificada, e a constante de desativação térmica ( $k_1$ ) foi obtida segundo a equação:

$$A = \alpha_1 e^{-k_1 t} \quad (3.18)$$

sendo  $\alpha_1$  a taxa de atividade específica  $E_1/E$  e  $A$  a atividade enzimática após um certo tempo ( $t$ ) de incubação na temperatura estudada, em percentagem. E o tempo de meia vida aparente ( $t_{1/2}$ ) foi calculado pela Equação 3.18 considerando  $A = 50$ .

### 3.2.7 Características Superficiais e Tratamento Químico da Fibra

Devido à ausência de trabalhos que referenciem o uso da fibra de casca coco verde como suporte, o presente trabalho tem, antes de tudo, um caráter exploratório frente a esta aplicação. Assim, buscou-se conhecer um pouco as características físicas do suporte através da observação da morfologia da superfície. As análises da morfologia da superfície da fibra foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), executadas na Embrapa Agroindústria Tropical, com o auxílio da funcionária Celli Muniz. A técnica utilizada para obtenção das microfotografias apresentadas neste trabalho encontra-se descrita no Apêndice B.

Tendo em vista a baixa capacidade do suporte, observada através dos resultados de imobilização, também foram estudados os efeitos de alguns tratamentos químicos na superfície da fibra de casca de coco verde. As fibras, assim obtidas, foram avaliadas quanto às modificações físicas através de microscopia eletrônica. A influência dos tratamentos no processo de imobilização também foi avaliada. Desta forma, após o tratamento químico ao qual a fibra foi submetida, realizaram-se experimentos de imobilização por adsorção e calculou-se a atividade recuperada (Equação 3.2) e o rendimento (Equação 3.3) obtido. Para imobilização da lipase por adsorção, fez-se uso de uma solução de CAL B – L2 (40 U/mL), que permaneceu em contato com o suporte sob rotação, a temperatura ambiente, por duas horas.

### 3.2.7.1 Oxidação com peróxido de hidrogênio

Alguns trabalhos relatam a oxidação no tratamento de superfícies lignocelulósicas (REYES, PERALTA-ZAMORA e DURÁN, 1998; SHUKLA e PAI, 2005), inclusive em materiais destinados a adsorção de metais (SHUKLA e PAI, 2005). Para a oxidação da fibra de casca coco verde, prepararam-se 100 mL de uma solução contendo 0,05 g de NaOH e 18 mL de peróxido de hidrogênio (30%, v/v). A 2 g de fibra, previamente lavada com água, adicionaram-se 40 mL da solução de NaOH com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e deixou-se em banho-maria a 85°C, sob agitação, por 2 horas. Realizou-se lavagem com 200 mL de água quente (temperatura de, aproximadamente, 100°C) e, posteriormente, lavagem com água fria (a temperatura ambiente) em excesso. Por fim, realizou-se secagem em estufa a 60°C.

### 3.2.7.2 Tratamento com clorito de sódio

Reyes, Peralta-Zamora e Durán (1998) estudaram alguns processos de deslignificação de casca de arroz, sendo os melhores resultados obtidos com o tratamento a base de clorito de sódio. Baseando-se nesta metodologia, a 100 mL de solução de NaOCl 0,4% (v/v, em ácido acético glacial), adicionaram-se 5 g de fibra lavada com água e deixou-se sob agitação, em banho-maria a 85°C, por duas horas. Posteriormente, lavou-se a fibra com água destilada em abundância para extrair qualquer resíduo dos produtos utilizados no tratamento e realizou-se secagem em estufa a 60°C até que a fibra tratada atingisse peso constante.

### 3.2.7.3 Tratamento com clorito de sódio e hidróxido de sódio

Tendo como referência alguns trabalhos que citam o uso de clorito de sódio no tratamento de superfícies (REYES, PERALTA-ZAMORA e DURÁN, 1998) e considerando o grande uso de hidróxido de sódio no tratamento de superfícies lignocelulósicas (MARTINS, KIYOHARA e JOEKES, 2004), realizou-se um tratamento misto. Para tanto, inicialmente, a 100 mL de solução de NaOCl 4-6%/H<sub>2</sub>O (1:1), adicionaram-se 5 g de fibra lavada com água e deixou-se o sistema sob agitação por duas horas. Posteriormente, lavou-se a fibra com 300 mL de água destilada, seguido de um tratamento com 100 mL de NaOH 10% (p/v), permanecendo sob agitação por uma hora. Ao final do tratamento, lavou-se a fibra com água destilada em abundância para extrair qualquer resíduo dos produtos

utilizados no tratamento e realizou-se secagem em estufa a 60°C até que se atingisse peso constante.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo do potencial da fibra de coco verde como suporte para a imobilização de lipase baseou-se em duas técnicas de imobilização, adsorção e ligação covalente. Para cada técnica utilizada, alguns fatores que influenciaram o processo de imobilização foram estudados de forma a avaliar a melhor condição de imobilização. A Tabela 4.1 mostra a seqüência de apresentação dos resultados e discussões das etapas desenvolvidas no presente estudo de forma a orientar a leitura dos que se convidarem a desbravar as linhas que se seguem.

**Tabela 4.1:** Etapas desenvolvidas no estudo do potencial da fibra de coco verde como suporte.

<b>Etapas do estudo</b>	<b>Metodologias correlacionadas</b>
4.1 Adaptação de metodologias	
4.1.1. Síntese de butirato de butila	3.2.2; 3.2.4.2
4.1.2 Funcionalização da fibra de coco	3.2.5.1; Apêndice C
4.2 Imobilização por adsorção	
4.2.1 Pré-tratamento da fibra	3.2.1; 3.2.4.1; 3.2.4.2
4.2.2 Influência do pH da fibra nas propriedades do biocatalisador	3.2.1; 3.2.2; 3.2.4.2; 3.2.4.5
4.2.3 Influência da concentração de enzima e do tempo de contato na imobilização	3.2.1; 3.2.3; 3.2.4.2; 3.2.4.3;
4.2.4 Influência do pH do meio no processo de imobilização	3.2.1; 3.2.3; 3.2.4.2; 3.2.4.4
4.2.5 Efeito da concentração de substrato na velocidade de hidrólise de butirato de metila catalisada por lipase	3.2.1; 3.2.4.2; 3.2.4.6
4.2.6 Estabilidade da enzima imobilizada por adsorção	3.2.1; 3.2.2; 3.2.6
4.3 Imobilização por ligação covalente	
4.3.1 Pré-tratamento da fibra com hexano	3.2.1; 3.2.2; 3.2.5.1; 3.2.5.2
4.3.2 Estudo da carga máxima de enzima	3.2.1; 3.2.5.1; 3.2.5.3; 3.2.6
4.3.3 Influência do pH de imobilização no processo de obtenção e nas propriedades do biocatalisador	3.2.1; 3.2.2; 3.2.3; 3.2.5.1; 3.2.5.4; 3.2.6

**Tabela 4.1:** Etapas desenvolvidas no estudo do potencial da fibra de coco verde como suporte (Continuação).

<b>Etapas do estudo</b>	<b>Metodologias correlacionadas</b>
4.4 Um paralelo entre imobilização por adsorção e por ligação covalente	
4.4.1 Desempenho do processo de imobilização	3.2.1; 3.2.4.2; 3.2.5.1
4.4.2 Estabilidade dos derivados obtidos	3.2.1; 3.2.2; 3.2.6
4.5 Breve estudo morfológico da superfície da fibra de coco verde	
4.5.1 Fibra natural: aspectos e variedades	Apêndice B
4.5.2 Remoção de impurezas: algumas tentativas de tratamentos químicos	3.2.1; 3.2.2; 3.2.7.1; 3.2.7.3; 3.2.4.2; Apêndice B
4.5.3 Fibra oxidada: mudanças morfológicas e químicas	3.2.1; 3.2.2; 3.2.7.2; 3.2.4.2; Apêndice B

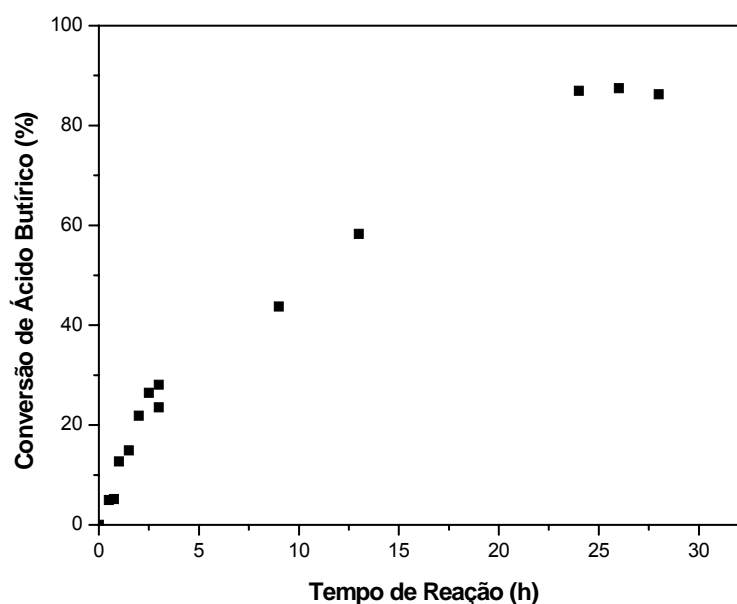
#### 4.1 ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIAS

O uso de uma dada metodologia para desenvolvimento de um certo experimento nem sempre é só uma questão de seguir um protocolo pré-estabelecido. Diferenças de equipamentos, marca dos reagentes, condições climáticas, substrato a ser analisado, são muitas as variantes que podem levar à necessidade de adaptações. Esta é uma das maiores habilidades de um pesquisador, não ser apenas aquele que interpreta os resultados, mas também aquele que ajusta e inventa formas de executar seu objeto de estudo. Foi diante desta necessidade de adaptação, devido à diferença do sistema empregado frente aos citados nas referências, que se realizaram os estudos na metodologia de síntese de butirato de butila e de funcionalização com GPTMS que se seguem.

##### 4.1.1 Síntese de Butirato de Butila

A fim de avaliar a dinâmica reacional do sistema estudado, acompanhou-se a conversão de ácido butírico com o tempo. Prepararam-se vários sistemas reacionais, submetidos às mesmas condições iniciais de temperatura (37°C) e concentração de substrato (150 mM). Em tempos pré-definidos, uma amostra de um dado sistema reacional foi retirada e a concentração de ácido butírico presente, quantificada. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.1, onde se pode observar que a

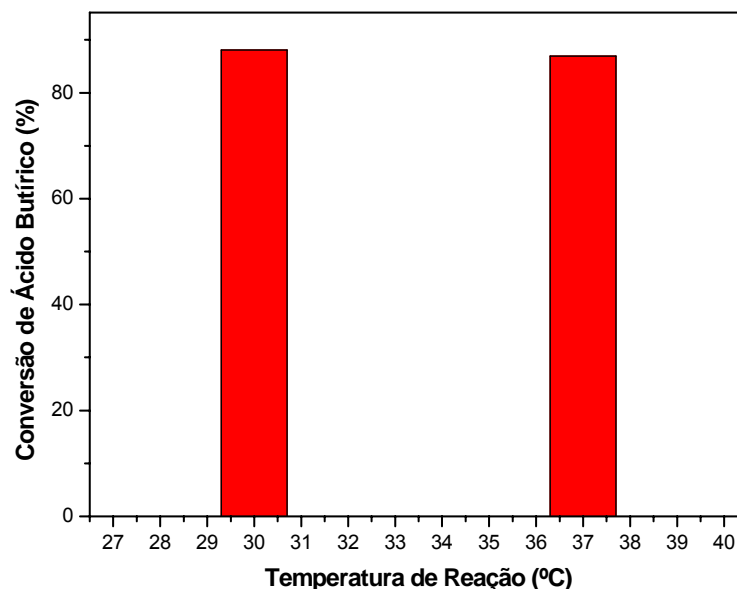
velocidade de reação varia linearmente com o tempo até 2 horas. Após este período, há uma redução na velocidade de síntese até que ela se estabiliza em 24 horas. Estes resultados permitiram estabelecer o tempo de 2 horas (velocidade inicial) como o adequado para a determinação da atividade de esterificação, baseada na conversão de ácido butírico, bem como o ponto no qual se observa a conversão máxima de ácido butírico, 24 horas de reação, sendo este selecionado para futuros estudos de síntese.



**Figura 4.1:** Avaliação da conversão de ácido butírico em função do tempo na síntese de butirato de butila a 37°C catalisada por lipase imobilizada em fibra de coco verde.

Ao fim desse estudo, havia-se testado a metodologia e avaliado sua reprodutibilidade, sendo observado o erro experimental de  $\pm 0,81$  (%) no valor da conversão de ácido butírico e  $\pm 0,66$  (U/g) no valor da atividade de esterificação. Contudo, considerando a baixa concentração de substrato usada e o fato da lipase tipo B de *C. antarctica* possuir boa atividade hidrolítica à temperatura ambiente, optou-se por estudar a influência da temperatura na reação de esterificação. Assim, realizou-se nova síntese a 30°C e, após 24 horas de reação, quantificou-se a concentração de ácido butírico presente no meio reacional. Conforme mostra a Figura 4.2, não houve variação significativa entre as conversões de ácido butírico de

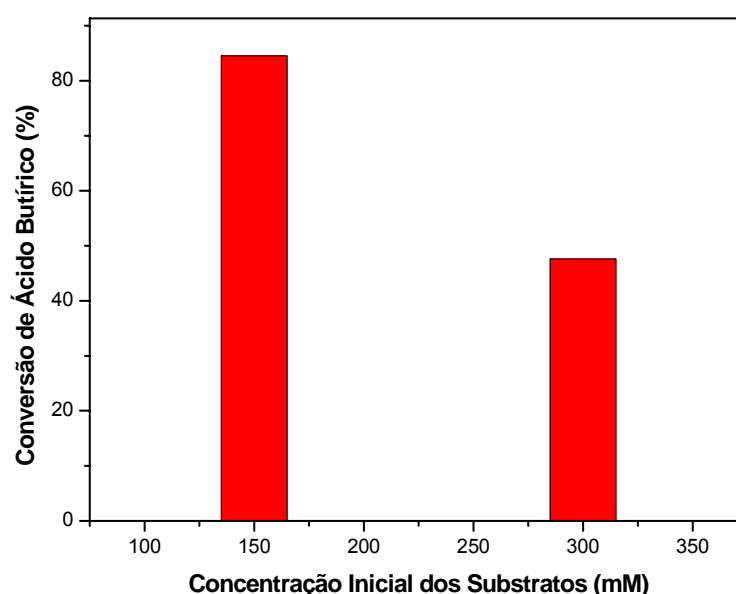
reações conduzidas a 30 ou 37°C, sendo a reação executável a 30°C sem perdas no rendimento.



**Figura 4.2:** Influência da temperatura de reação na conversão de ácido butírico durante síntese de butirato de butila catalisada por lipase imobilizada em fibra de coco verde.

Quando se optou por usar a síntese de butirato de butila como parâmetro para reação de esterificação, observou-se que várias são as concentrações de ácido butírico e de n-butanol passíveis de uso (SOARES *et al.*, 1999; OLIVEIRA, ALVES e CASTRO, 2000; CASTRO, SILVA e SILVA, 2000; SOARES *et al.*, 2004). A formulação mais adequada varia de sistema para sistema, tendo sido adotado como parâmetro o coeficiente de partição entre os substratos e a matriz sólida para definir as concentrações mais adequadas para o dado sistema (CASTRO, OLIVEIRA e SOARES, 1997; CASTRO, OLIVEIRA e PEREIRA, 2000). Além disso, com base nas observações realizadas por Chulalaksananukul *et al.* (1990), o excesso de álcool pode agir como um inibidor competitivo na reação de esterificação, impedindo a formação do complexo enzima-ácido. Portanto, deve-se considerar a possível ação do n-butanol como inibidor da enzima, quando em elevadas concentrações no meio reacional. Considerando a baixa carga enzimática dos derivados obtidos, bem como buscando evitar a ação de n-butanol como inibidor, optou-se por realizar a síntese de butirato de butila utilizando baixas concentrações de substrato. Como não era

objetivo desta dissertação otimizar a presente reação de síntese, não foram realizados estudos em diferentes proporções de concentrações de ácido e álcool. Assim, avaliou-se apenas o desempenho do derivado obtido por adsorção frente a concentrações equimolares de ácido butírico e butanol de 150 mM e 300 mM. A reação de síntese ocorreu a 30°C. Menor conversão foi observada na concentração de 300 mM (Figura 4.3), podendo caracterizar um efeito inibidor dos substratos ou o fato de que, devido à presença de maior quantidade de substrato, o sistema não tenha chegado ao equilíbrio no período de 24 horas.



**Figura 4.3:** Influência da concentração inicial dos substratos na conversão de ácido butírico para síntese de butirato de butila catalisada por lipase imobilizada em fibra de coco verde, a 30°C por 24h.

A partir dos resultados obtidos, a metodologia de síntese de butirato de butila para este trabalho foi padronizada e as condições operacionais foram: esterificação de ácido butírico com n-butanol em heptano, utilizando concentrações equimolares iguais a 150 mM e meio reacional no total de 20 mL, catalisada por 0,3 g de biocatalisador, na presença de 1 g de peneira molecular 4A, a 30°C, sob agitação de 150 rpm, em sistema hermeticamente fechado. A atividade de síntese foi calculada após 2 horas de reação e a conversão de ácido butírico foi calculada para 24 horas de reação.

#### 4.1.2 Funcionalização da Fibra de Coco com GPTMS

Devido à baixa área superficial da fibra, avaliou-se o uso de uma concentração de GPTMS menor do que a referenciada por Pereira (1996) e observou-se a influencia desta modificação na quantidade de grupamentos aldeídos obtidos no suporte funcionalizado. O grau de ativação da fibra obtida por silanização com GPTMS a 5% (v/v) foi, em média, de  $132,74 \pm 2,57 \mu\text{mol}$  de CHO/g de fibra, enquanto que, para a silanização com GPTMS a 1% (v/v), foram obtidos  $132,03 \pm 2,57 \mu\text{mol}$  de CHO/g de fibra. Considerando que para ambas as concentrações o erro foi o mesmo, e que a diferença de valores do grau de ativação entre elas encontra-se dentro do erro experimental, pôde-se concluir que não houve influência no grau de ativação para as concentrações de GPTMS estudadas. Compararam-se também os biocatalisadores obtidos após silanização, com as diferentes concentrações de GPTMS, e imobilização enzimática partindo de uma mesma solução inicial de enzima contendo 40 U/mL, a pH 7. As atividades de hidrólise dos derivados obtidos a partir de fibra funcionalizada com 5% e 1% de GPTMS foram, respectivamente,  $33,96 \pm 2 \text{ U/mL}$  e  $32,24 \pm 2 \text{ U/mL}$ . Como não houve variação significativa entre os valores de atividade obtidos, fixou-se em 1% (v/v) a concentração de GPTMS utilizado para obtenção de fibra funcionalizada.

Para evitar a obtenção de superfícies muito densas, que poderiam inativar as enzimas imobilizadas, em geral, realiza-se o cálculo da densidade de grupos aldeídos na superfície do suporte ( $D_s$ ). Esta densidade é definida como o número de resíduos de grupos ativos por  $1.000 \text{ \AA}^2$  de suporte, sendo  $D_s$  calculada pela equação 4.1:

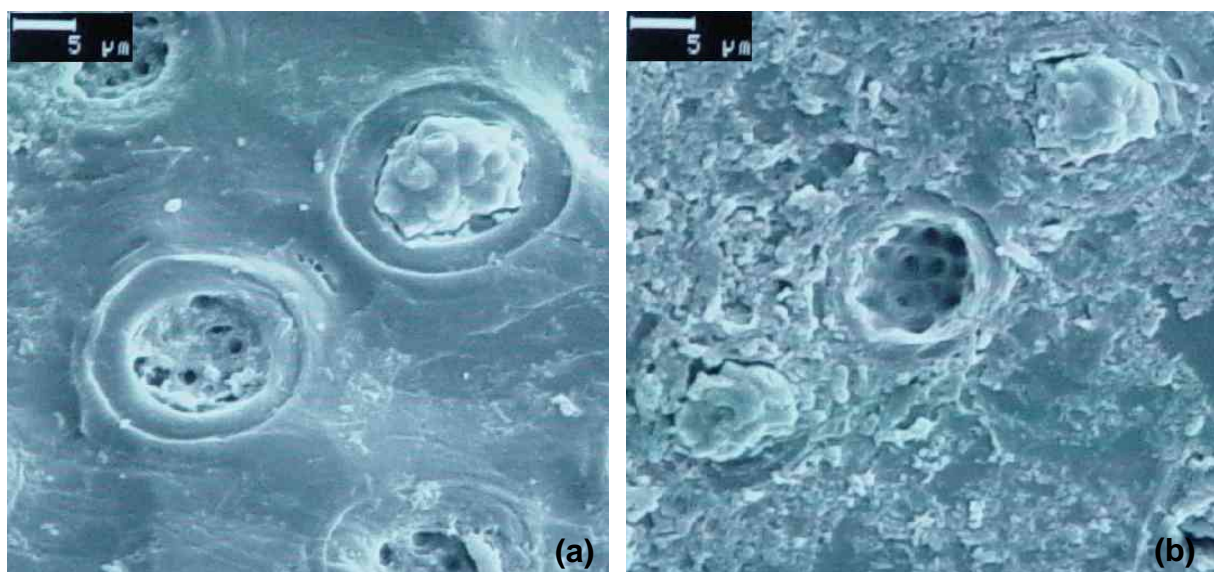
$$D_s = \frac{G_A Su \times 6,02}{A_{BET}} \quad (4.1)$$

sendo  $A_{BET}$  a área superficial BET do suporte dada em  $\text{m}^2/\text{g}$  e  $G_A Su$  (Equação 3.12) a quantidade de grupos aldeídos, em  $\mu\text{mol}$ , presentes em 1 grama de suporte (FERREIRA *et al.*, 2003).

Pereira (1996) obteve um valor de  $D_s$  igual a 14,89 resíduos por  $1.000 \text{ \AA}^2$  de sílica, na imobilização de penicilina G acilase, enquanto Ferreira *et al.* (2003) utilizou uma sílica na imobilização de alcalase cuja densidade era de 21 resíduos por  $1.000 \text{ \AA}^2$  de suporte. Objetivando calcular a densidade de grupos aldeídos

presentes na fibra, buscou-se, fazendo uso do Autosorb, determinar a sua área superficial (Apêndice C). Contudo, devido a sua baixa densidade (0,44 g/mL) e sua baixa área superficial, não foi possível fornecer uma área igual a 5 m<sup>2</sup> para que o equipamento trabalhasse dentro de sua sensibilidade, impossibilitando, assim, os cálculos de densidade de grupos aldeídos para a fibra.

Para se verificar a funcionalização da fibra, utilizou-se um microscópio eletrônico e as fotos obtidas são mostradas na Figura 4.4. Pode-se observar nitidamente a presença de GPTMS em fibra funcionalizada.



**Figura 4.4:** Microfotografia de uma fibra de coco (a) bruta e (b) funcionalizada com GPTMS, aumento de 2000 x.

## 4.2 IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO

A imobilização por adsorção é resultado de vários tipos de interações envolvendo a enzima, o suporte, o solvente e alguns solutos que por ventura possam estar presentes, dentre as quais, destacam-se interações eletrostáticas e hidrofóbicas (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988). Tais interações podem ser influenciadas por vários fatores como: pH do meio, temperatura, concentração de enzima e presença de aditivos. Neste contexto, realizou-se a imobilização da lipase tipo B de *C. antarctica* por adsorção em fibra de coco verde sob diferentes condições, a fim de se obter um derivado com alta eficiência catalítica, além de elevada estabilidade térmica e operacional.

#### 4.2.1 Pré-Tratamento da Fibra

Quando se procedeu a lavagem da fibra bruta com água, observou-se uma cor amarelada na água de lavagem, além de uma elevada turbidez, provocada pela presença de impurezas sólidas como o pó de coco. Tais resíduos, bem como o elevado teor de sais (condutividade elétrica em torno de 4,7 dS/m) presentes na casca de coco verde, foram observados anteriormente por Rosa *et al.* (2002a). Assim, a lavagem foi realizada até que se obtivesse uma água de lavagem incolor. Durante o tratamento com SDS, realizado com o intuito de provocar a dessorção de qualquer proteína naturalmente adsorvida na fibra, também foi observada a liberação de pigmento para a solução aquosa. A presença de impurezas na fibra foi constatada por microscopia eletrônica (item 4.5). Estudos da influência do pré-tratamento da fibra no desempenho da imobilização de lipase por adsorção mostraram que uma menor atividade e rendimento de imobilização foram observados para a fibra bruta e que não houve diferença entre a lavagem com água destilada e a lavagem com SDS (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2:** Influência do pré-tratamento da fibra na atividade enzimática do biocatalisador obtido por imobilização de lipase por adsorção.

<b>Suporte</b>	<b>Atividade no derivado (U/g)</b>
Fibra bruta	41,3 ± 2
Fibra lavada c/ água	47,8 ± 2
Fibra lavada c/ SDS	49,8 ± 2

Considerando que o uso da fibra bruta, além de favorecer a liberação de impurezas para o meio reacional, promove um menor rendimento de imobilização e uma leve redução na atividade do derivado, concluiu-se que era inviável seu uso como suporte. Com base nos resultados mostrados na Tabela 4.2, a lavagem da fibra com água destilada se mostrou suficiente para a obtenção de um suporte aparentemente livre de impurezas. Portanto, esse método foi selecionado para realização dos estudos posteriores de imobilização.



#### 4.2.2 Influência da Neutralização da Fibra nas Propriedades do Biocatalisador

Conforme mostra a Tabela 4.3, quando o pH da superfície da fibra é igual a 5, observou-se uma melhor imobilização, proporcionando maior atividade hidrolítica e de esterificação no derivado obtido, além de uma maior conversão de ácido butírico após 24 horas de reação.

Com o objetivo de verificar se os suportes provocavam migração dos grupos acila para sua superfície, colocou-se soluções de ácido butírico 150 mM em heptano em contato com a fibra por 24 horas. Após este período, mediu-se a concentração de ácido butírico e observou-se que não houve variação significativa entre a concentração inicial e a concentração final. Isto indica que os suportes não interferem na migração, mesmo que o suporte a pH 5 seja carregado negativamente.

**Tabela 4.3:** Características dos derivados obtidos após imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco verde em diferentes valores pH para a superfície.

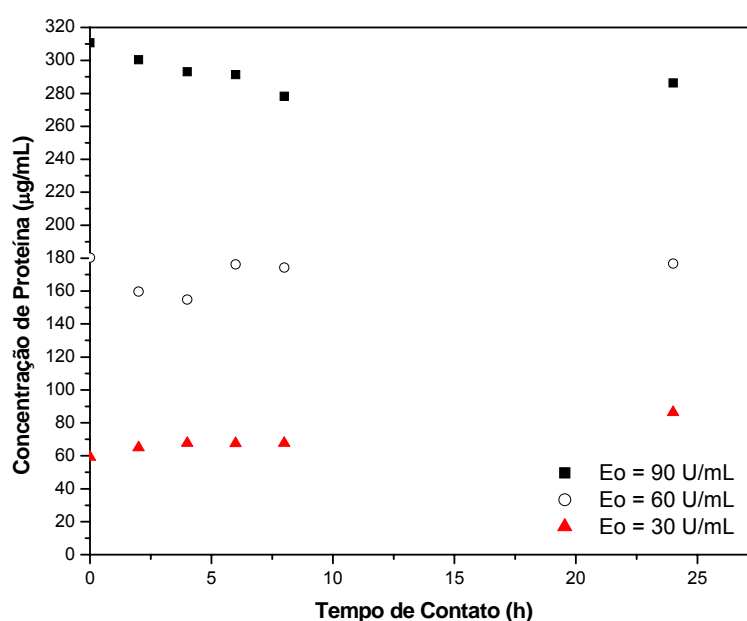
Parâmetros	pH da superfície da fibra	
	7	5
Atividade hidrolítica do derivado (U/g)	18,06 ± 2,65	26,01 ± 3,1
Atividade recuperada (%)	29,74 ± 0,73	64,63 ± 1,13
Rendimento de imobilização (%)	16,3 ± 1,4	10,84 ± 1,51
Atividade de esterificação (U/g)	4,61 ± 0,66	9,22 ± 0,66
Conversão de ácido butírico (%)	54,10 ± 0,97	87,67 ± 0,81

Considerando que não há interferência do suporte na concentração de ácido butírico disponível para a reação de esterificação e que em suportes a pH 7 a atividade do derivado e a atividade recuperada são menores, selecionou-se a fibra a pH 5 como a mais adequada para a imobilização de CAL B.

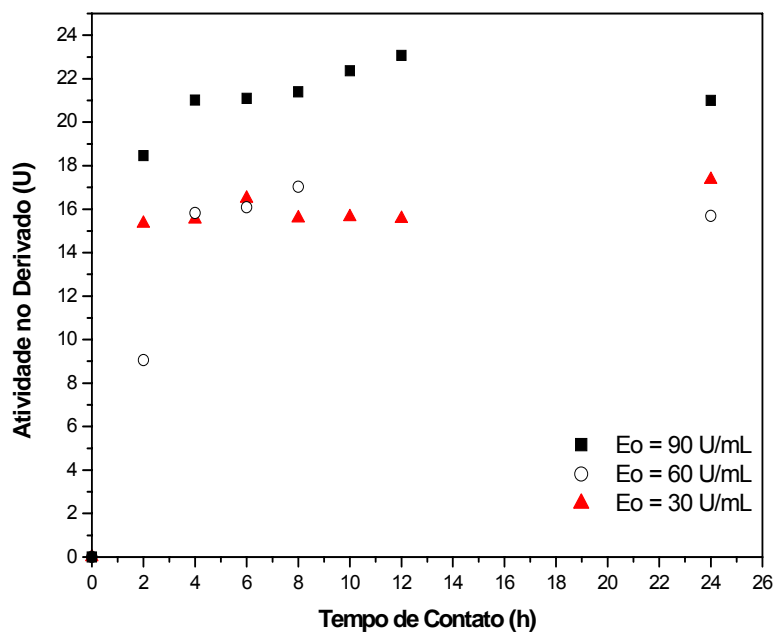
#### 4.2.3 Influência da Concentração de Enzimas e do Tempo de Contato na Imobilização

A partir do estudo cinético de adsorção de lipase em fibra de coco verde, observou-se que, para todas as concentrações iniciais de enzimas testadas, não

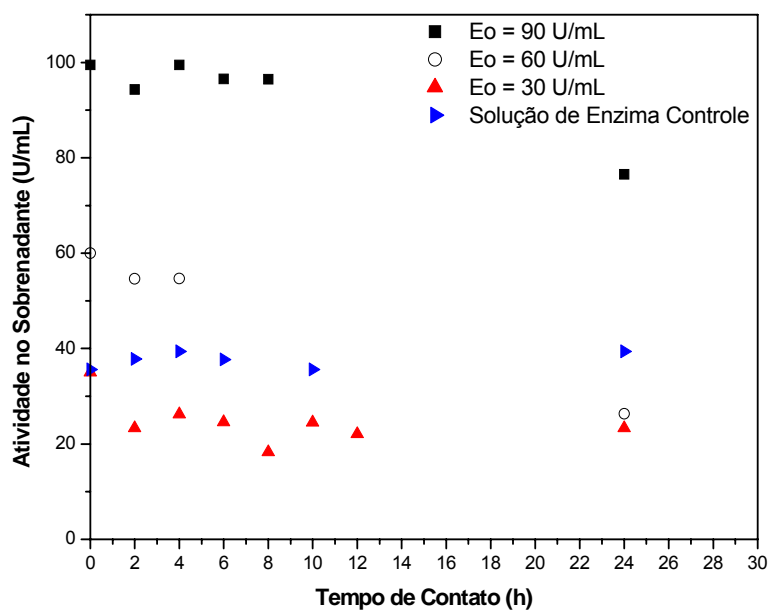
houve variação significativa na quantidade de proteína presente no sobrenadante (Figura 4.5). Isto indicou que a quantidade de proteína adsorvida na fibra foi muito baixa, de forma que não foi possível calculá-la. Mas, o estudo da atividade do derivado obtido mostrou que houve imobilização (Figura 4.6) para todas as concentrações iniciais avaliadas. Para imobilização a partir de uma solução contendo 30 U/mL, após duas horas de contato entre solução enzimática e suporte, não houve variação significativa na atividade hidrolítica do derivado obtido. Quanto à atividade hidrolítica do sobrenadante, observou-se que até 12 horas de contato não houve variação significativa nos valores obtidos (Figura 4.7). Porém, as soluções de CAL B, cujas concentrações iniciais eram 60 e 90 U/mL, após 24 horas de contato com a fibra, mostraram menor atividade hidrolítica. Cabe ressaltar que se avaliou a estabilidade de uma solução de enzima durante 24 horas, sob as mesmas condições de imobilização mas na ausência de fibra, e não se observou perda de atividade catalítica, ou seja, a enzima manteve o mesmo valor de atividade hidrolítica (observado no tempo zero hora) durante as 24 horas avaliadas. Logo, esta queda no valor de atividade, provavelmente, foi provocada pela presença de algum agente contaminante presente na fibra, o qual desativou algumas enzimas das soluções estudadas.



**Figura 4.5:** Variação da concentração de proteína no sobrenadante em função do tempo durante a imobilização por adsorção de lipase tipo B de *C. antarctica*, a pH 7,0 e temperatura ambiente.



**Figura 4.6:** Variação da atividade enzimática no derivado em função do tempo durante a imobilização por adsorção de lipase tipo B de *C. antarctica*, a pH 7,0 e temperatura ambiente.



**Figura 4.7:** Variação da atividade hidrolítica no sobrenadante em função do tempo durante a imobilização por adsorção de lipase tipo B de *C. antarctica*, a pH 7,0 e temperatura ambiente.

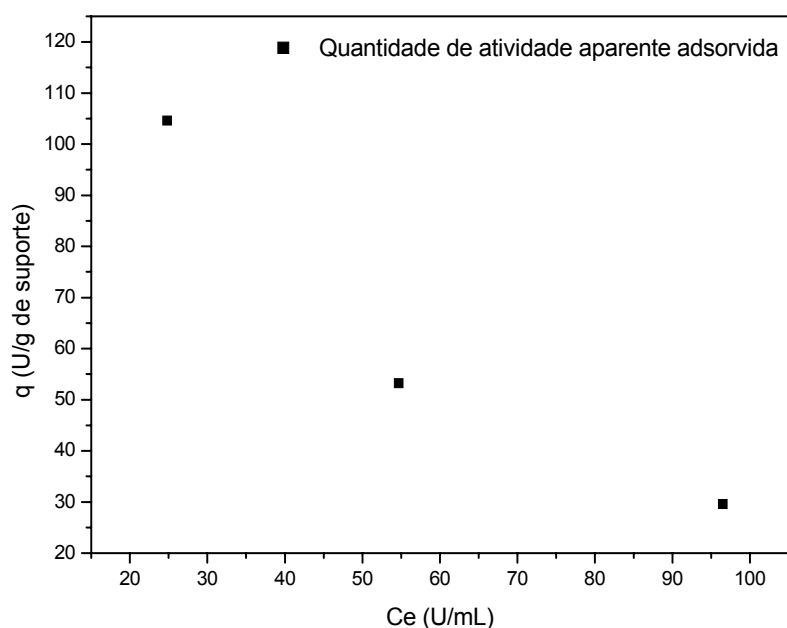
Considerando o tempo de adsorção de duas horas, calculou-se a atividade recuperada e o rendimento da imobilização para as diferentes concentrações iniciais de enzima (Tabela 4.4). Verificou-se um aumento na atividade recuperada com o aumento da atividade inicial oferecida. Tal fato se deve, provavelmente, a um melhor rearranjo das enzimas adsorvidas no suporte, provocado pela tendência destas adsorverem mais próximas uma das outras quando maiores quantidades de enzima estão presentes. Maiores quantidades de enzima limitam os espaços vazios no suporte e restringem a área de contato enzima-suporte, o que reduz as mudanças conformacionais negativas do sítio ativo ocasionadas pelo processo de adsorção (SOARES *et al.*, 2002). Com relação ao rendimento de imobilização, observa-se uma redução com o aumento da concentração de enzimas. Isto é justificável pela baixa área superficial da fibra de coco verde, o que limita a quantidade de enzima a ser adsorvida no suporte.

**Tabela 4.4:** Atividade recuperada e rendimento de imobilização de lipase em fibra de coco verde por adsorção para diferentes concentrações iniciais de enzima, a pH 7,0 e temperatura ambiente.

Concentração de enzima (U/mL)	Atividade Recuperada (%)	Rendimento (%)
30	32,9	33,4
60	42,1	9,0
90	86,9	5,2

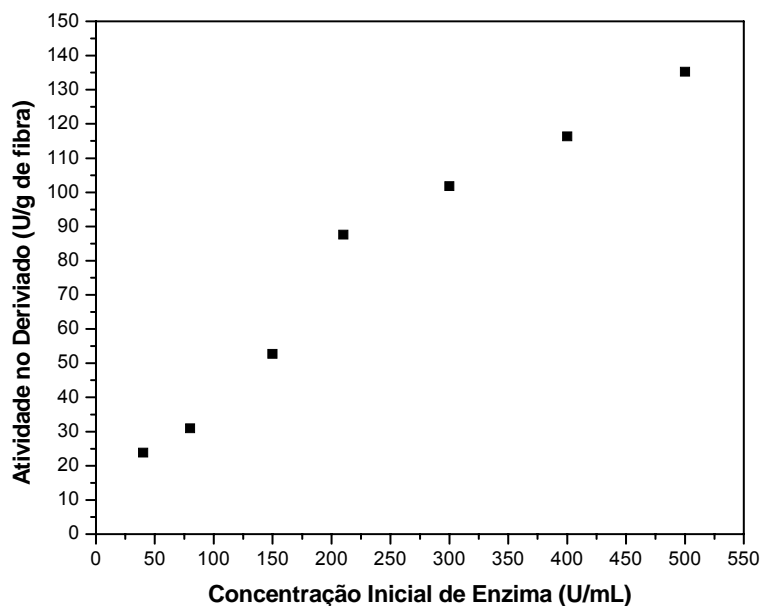
Considerando o tempo de duas horas como ponto de equilíbrio da cinética de adsorção para o intervalo de concentração estudado, tentou-se descrever a isoterma de adsorção. Esperava-se inicialmente um aumento da quantidade de enzima adsorvida no suporte ( $q$ ) com o aumento da concentração de adsorbato no sobrenadante até um certo ponto a partir do qual ele permaneceria constante. Contudo, o que se observou foi um decaimento (Figura 4.8), sendo este comportamento possivelmente causado pela dificuldade experimental de se determinar a diferença entre atividade enzimática inicial e final no sobrenadante quando altas concentrações de enzimas estão presentes. Tal diferença tende a diminuir com o aumento da concentração inicial de enzimas, devido à baixa área superficial da fibra, dando a impressão de que maiores concentrações de enzima

desfavorecem a adsorção. A análise da Figura 4.7 mostra valores próximos de atividade no derivado obtido a partir de soluções de CAL B em concentrações iniciais de 30 e 60 U/mL, e um valor maior de atividade no derivado obtido a partir 90 U/mL. Tais resultados mostram que o aumento da concentração de enzima favoreceu a adsorção de lipase na fibra.

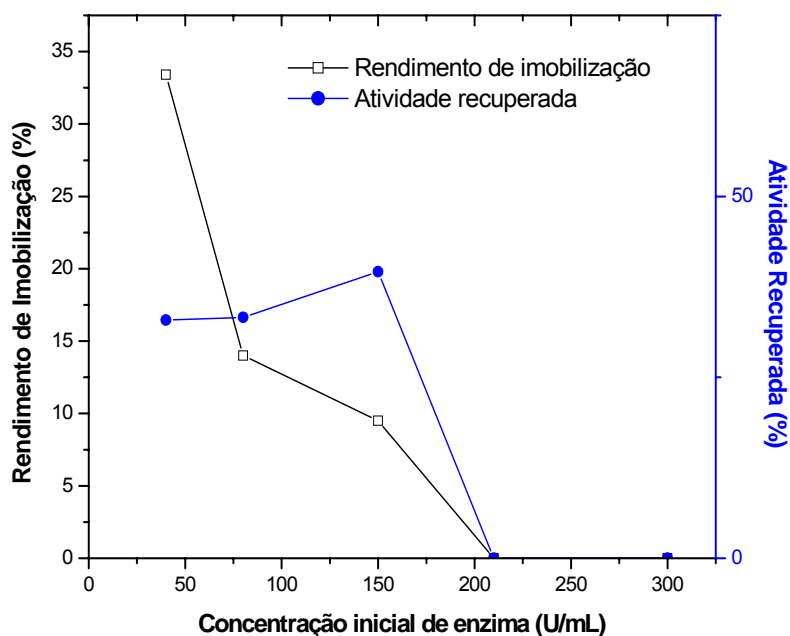


**Figura 4.8:** Atividade aparente adsorvida na fibra do coco após a imobilização por adsorção de lipase tipo B de *C. antarctica*, a pH 7,0 e temperatura ambiente, para diferentes concentrações iniciais de enzima.

Experimentos de imobilização realizados com a CAL B – L2, para diferentes concentrações iniciais de enzimas, por um período de duas horas, também mostraram um aumento de atividade no derivado obtido (Figura 4.9) em função do aumento da concentração de enzima no sobrenadante. Contudo, valores de atividade recuperada e rendimento para as concentrações de 210 e 280 U/mL foram zero devido à inexistência de diferença entre atividade do sobrenadante antes e após o processo de imobilização (Figura 4.10).



**Figura 4.9:** Variação da atividade enzimática no derivado obtido a partir de imobilização por adsorção utilizando diferentes concentrações iniciais de enzima, pH 7,0 e temperatura ambiente.



**Figura 4.10:** Variação dos valores de atividade recuperada e rendimento de imobilização obtidos na imobilização por adsorção utilizando diferentes concentrações iniciais de enzima, pH 7,0 e temperatura ambiente.

Como observado anteriormente com soluções de CAL B – L1, quanto maior a concentração de lipase oferecida para a imobilização, menor a diferença na medida de atividade do sobrenadante antes e após o processo de imobilização. Comparando dois experimentos de imobilização realizados a partir de diferentes concentrações iniciais no sobrenadante 40 U/mL e 210 U/mL de lipase, e considerando que, para cada 1 mL de solução de enzima, utilizou-se apenas 0,1 g de fibra, foi possível compreender melhor a influência de altas concentrações nos valores de atividade recuperada e rendimento de imobilização. Quando a imobilização foi realizada à concentração inicial de enzima de 40 U/mL, foram oferecidas 34,98 U de atividade ao suporte, sendo obtidas 3,8 U imobilizadas, o que promove uma variação de 3,8 U/mL na atividade do sobrenadante. Enquanto que quando a imobilização foi realizada com concentração inicial de 210 U/mL, a variação na atividade do sobrenadante foi de 8,76 U/mL. Experimentos anteriormente realizados para avaliar o erro experimental de determinação do valor de atividade de soluções de CAL B, em tampão fosfato pH 7, mostraram que ele é diretamente proporcional à concentração de enzima estudada (Tabela 4.5). Comparando a faixa de erro experimental para leituras de atividade enzimática de soluções a 280 U/mL de concentração inicial com a variação de atividade obtida na imobilização a partir de uma solução com 210 U/mL de enzima, observou-se que a diferença nos valores de atividade do sobrenadante após o processo de imobilização encontra-se dentro da faixa do erro experimental, assim, os valores de atividade recuperada e rendimento, que dependem desta diferença, são totalmente mascarados pelo erro na medida de atividade.

**Tabela 4.5:** Estimativa do erro experimental para as leituras de atividade hidrolítica determinadas a partir da hidrólise de butirato de metila a diferentes concentrações de lipase.

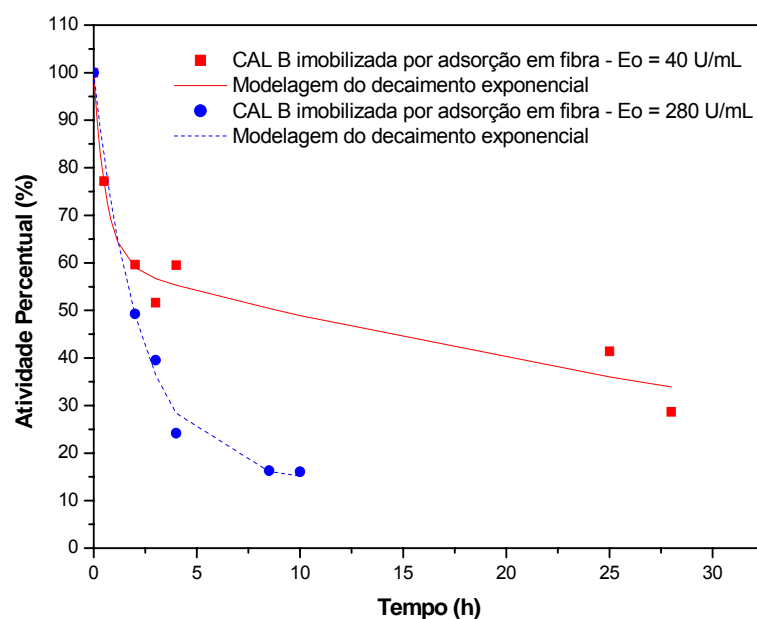
Concentração de enzima (U/mL)	Atividade hidrolítica (U/mL)	Erro experimental
40	18,47	± 2,35
150	98,25	± 6,06
280	285,61	± 9,95

Alguns autores mencionam a adsorção de lipases em multicamada, a qual ocorre principalmente quando se trabalha com altas concentrações iniciais de enzima (AL-DURI e YONG, 2000). Segundo Arroyo, Sánchez-Montero, e Sinisterra (1999) a formação de multicamadas pode ser avaliada através de ensaios de estabilidade térmica. Em geral, observa-se menor estabilidade de enzimas imobilizadas em multicamadas quando comparadas a estabilidade de enzimas imobilizadas em monocamada. Desta forma, a fim de avaliar se há formação de multicamadas na imobilização de CAL B em fibra de coco quando altas concentrações de enzima foram utilizadas, comparou-se a estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir de soluções de enzima contendo inicialmente 40 e 280 U/mL. A Figura 4.11 mostra os resultados de estabilidade térmica para os dois derivados avaliados. Percebe-se claramente uma queda mais acentuada da atividade do derivado obtido a partir de  $E_0 = 280$  U/mL. Ajustando-se os pontos experimentais ao modelo de desativação térmica descrito pela Equação 3.14, observou-se taxas de atividade específicas ( $\alpha_1$ ) de 59,24 e 14,25 para imobilização com concentração inicial de 40 U/mL e 280 U/mL, respectivamente (Tabela 4.6). Essa diferença de atividade no estado intermediário  $E_1$ , também observada por Arroyo, Sánchez-Montero e Sinisterra (1999), indica a formação de multicamadas no derivado obtido por imobilização a partir de uma concentração inicial de enzima de 280 U/mL.

**Tabela 4.6:** Parâmetros cinéticos da desativação térmica, a 60°C, da lipase CAL B imobilizada por adsorção em fibra de coco, a pH 7, para diferentes concentrações iniciais de enzima no sobrenadante.

Enzimas	$k_1$ (h <sup>-1</sup> )	$k_2$ (h <sup>-1</sup> )	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$t_{1/2}$ (h)	F
Derivado c/ $E_0 = 40$ U/mL	1,642	0,0204	59,24	0	8,92	92,15
Derivado c/ $E_0 = 280$ U/mL	0,451	0	14,25	0	1,94	20,04





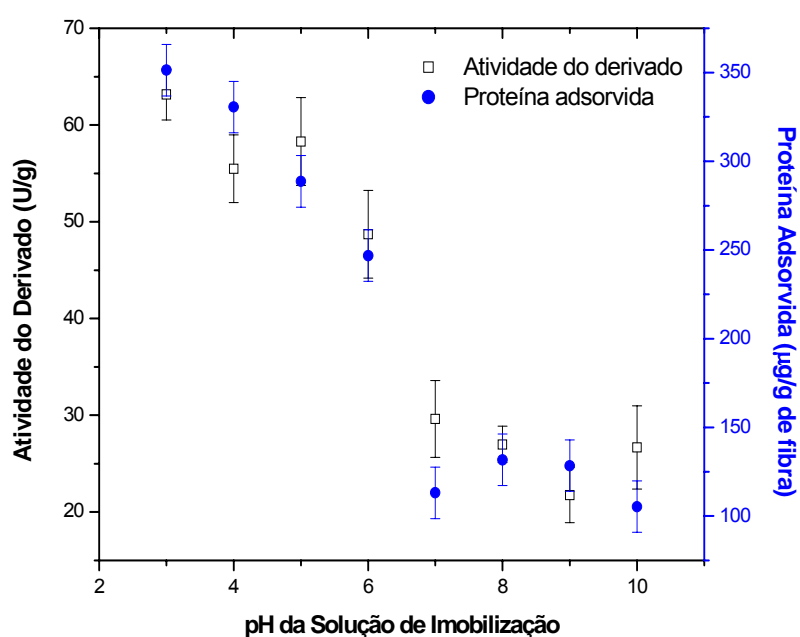
**Figura 4.11:** Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase de *C. antarctica* em fibra de coco por adsorção, a pH 7, para diferentes concentrações iniciais de enzima.

Apesar de derivados mais carregados terem sido obtidos quando as imobilizações foram executadas com concentrações iniciais de enzima iguais ou maiores que 150 U/mL, observou-se o fenômeno de adsorção em multicamada a  $E_0 = 280$  U/mL. Além disso, devido à falta de confiabilidade nos resultados de atividade recuperada e rendimento de imobilização para concentrações de enzima iguais ou maiores que 150 U/mL, atividades iniciais de 30, 40 e/ou 80 U/mL foram utilizadas nos experimentos que se seguiram. Assim, os efeitos das variáveis estudadas não foram encobertos pela ausência de diferença detectável entre o sobrenadante no estágio inicial e final da imobilização.

#### 4.2.4 Influência do pH do Meio no Processo de Imobilização

Segundo estudos realizados por Rocha, Gil e Garcia (1998), não só o pH do meio como também o tampão utilizado influenciaram no processo de imobilização. Desta forma, para que não houvesse interferência do tipo de tampão no processo de imobilização, fez-se uso apenas do tampão fosfato 25 mM com diferentes valores de pH. Para valores fora da faixa tamponante, o mesmo foi saturado com uma solução de HCl ou de NaOH para que fossem obtidos os valores de pH desejados.

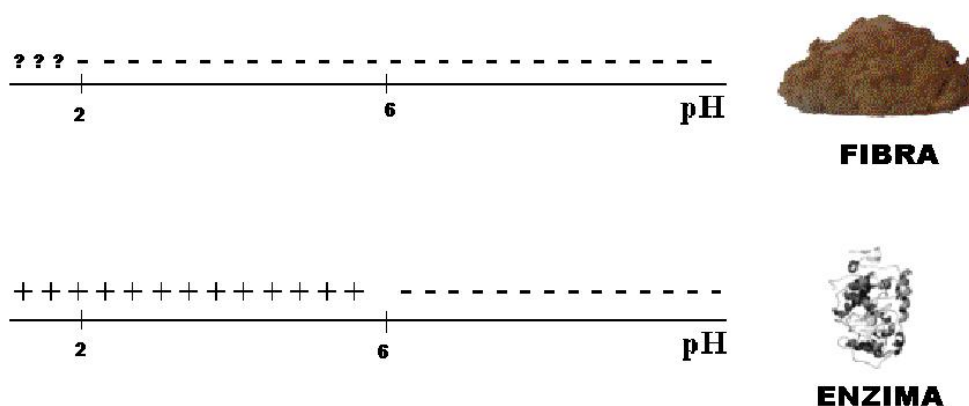
Conforme mostra a Figura 4.12, a imobilização em diferentes valores de pH mostrou dois patamares de valores de atividade no derivado e de proteína adsorvida (Equação 3.7), um superior, para imobilizações em pH entre 3 e 6, e um inferior, em pH entre 7 e 10. Essas variações no processo imobilização frente ao pH do meio são características de suportes iônicos (GITLESEN, BAUER e ADLERCREUTE, 1997), o que indica que, além das forças de Van der Waals presentes pela adsorção física, também se encontram forças eletrostáticas atuando na imobilização de lipase em fibra de coco.



**Figura 4.12:** Valores de atividade de lipase imobilizada em fibra de coco verde por adsorção, a temperatura ambiente, em função do pH do meio dispersante.

Sabendo-se que lipases são proteínas, mudanças de pH provocam alterações no caráter iônico dos grupos aminos e dos grupos carboxílicos, afetando, assim, o sítio catalítico e a sua conformação. Logo, para cada valor de pH do meio, a enzima possui uma distribuição de cargas distintas promovendo um valor de carga total e, conseqüentemente, uma conformação específica, sendo o ponto isoelétrico o ponto de equilíbrio de cargas presentes em uma dada enzima (CONN e STUMPF, 1980). No caso específico da lipase do tipo B de *C. antarctica*, sabe-se que seu ponto isoelétrico é em torno do pH 6 (UPPENBERG *et al.*, 1994), logo, valores de pH maiores que 6 conferem a mesma uma carga negativa. Em paralelo, Pino (2005) observou que, para valores de pH entre 2 e 10, o potencial zeta do pó da casca de

coco apresenta valores negativos. Além disso, estes potenciais tendem a ter valores mais negativos com o aumento do pH, consequência da ionização dos grupos carboxilas a altos valores de pH. E, apesar de ter detectado o potencial numa dada faixa de pH, Pino (2005) não conseguiu determinar o ponto isoelétrico do pó da casca de coco. Logo, considerando que a fibra de coco verde é um material cuja origem é a mesma do pó (casca de coco verde) e que ambos são materiais lignocelulóticos (composto por celulose, hemicelulose, lignina, dentre outros) que possuem grupos hidroxilas e carboxilas em sua superfície, estima-se que a fibra possua cargas iguais ao pó nas mesmas faixas de pH. A Figura 4.13 mostra a variação das cargas da fibra e da enzima de acordo com o pH do meio.

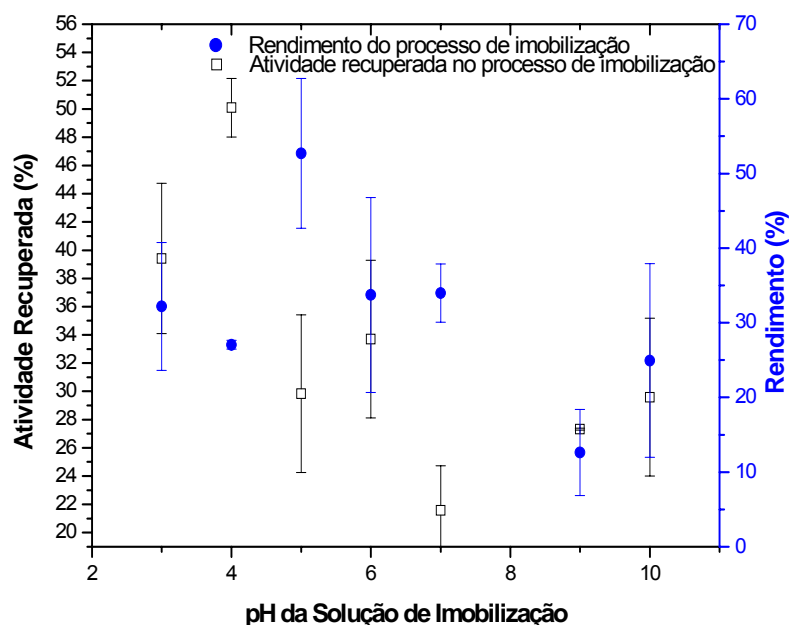


**Figura 4.13:** Cargas da fibra de coco verde e da lipase tipo B de *C. antarctica* a diferentes valores de pH.

Analisando os dados das Figuras 4.12 e 4.13, observou-se que a maior atividade no derivado foi obtida quando o sistema fibra-enzima encontrava-se com cargas contrárias. Entre 3 e 6, a imobilização tende a ser maior já que as cargas opostas tendem a aumentar a atração da enzima à fibra, facilitando a imobilização. A valores de pH acima de 6, as cargas de ambas são negativas e a adsorção tende a ser prejudicada devido à repulsão. Desta feita, estima-se que o valor de pH ótimo para imobilização por adsorção encontra-se na faixa entre 3 e 6.

De acordo com Geluk *et al.* (1992), no ponto isoelétrico da enzima, a mesma se encontra bastante estável e tende a sofrer repulsões laterais mínimas. Assim, a adsorção tende a ser beneficiada e observa-se um maior rendimento. No presente estudo, melhores rendimentos foram obtidos em pH 5 e 6 (Figura 4.14), próximos ao pH do ponto isoelétrico da enzima utilizada. E como a faixa de erro para estes valores é elevada, pode-se dizer que os rendimentos obtidos tanto a pH 5 como a

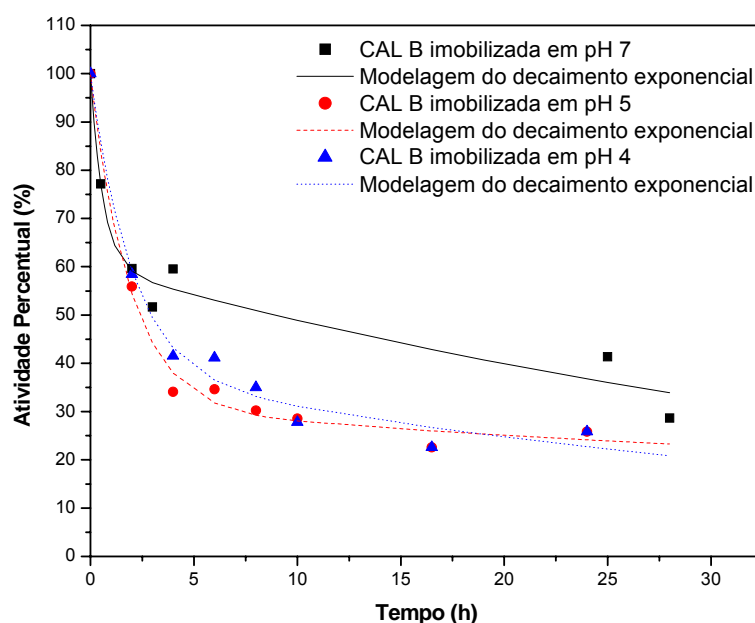
pH 6 são equivalentes. Contudo, analisando as atividades recuperadas de imobilização, maior valor foi observado a pH 4, como mostra a Figura 4.14. Nos valores de pH 5 e 6, as atividades recuperadas no processo de imobilização foram bem menores. Como os valores de atividade dos derivados obtidos na faixa de pH entre 4 e 6 foram equivalentes, o valor de pH ótimo para imobilização é aquele que promove maior atividade recuperada, ou seja, pH 4.



**Figura 4.14:** Atividade recuperada e rendimento do processo de imobilização de lipase em fibra de coco verde por adsorção, a temperatura ambiente, para diferentes valores de pH.

A fim de avaliar a estabilidade dos derivados obtidos a pH considerado ótimo para a imobilização de CAL B em fibra de coco verde por adsorção, realizou-se estudo de estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir de imobilização em pH 4 e compararam-se os resultados com os do derivado obtido a pH 7. Também se realizou estudo a pH 5 de modo a avaliar alguma influência do rendimento. A Figura 4.15 mostra que os perfis de desativação dos derivados obtidos a pH 4 e pH 5 foram bem próximos. Todavia, estes derivados mostraram-se menos estáveis que os derivados obtidos a pH 7, sendo que o tempo de meia vida do derivado obtido a pH 4 foi 76% menor do que do derivado obtido a pH 7 (Tabela 4.7). Considerando que o pH ótimo da CAL B encontra-se entre 7 e 8 (PETERSEN, FOJAN e PETERSEN, 2001), é possível que a mesma, quando imobilizada a pH 4

ou 5, tenha se adsorvido numa conformação não muito estável, o que promoveu uma desativação mais rápida frente à enzima imobilizada a pH 7.



**Figura 4.15:** Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco por adsorção, cuja concentração inicial de enzima foi 40 U/mL, para diferentes valores de pH do meio de imobilização.

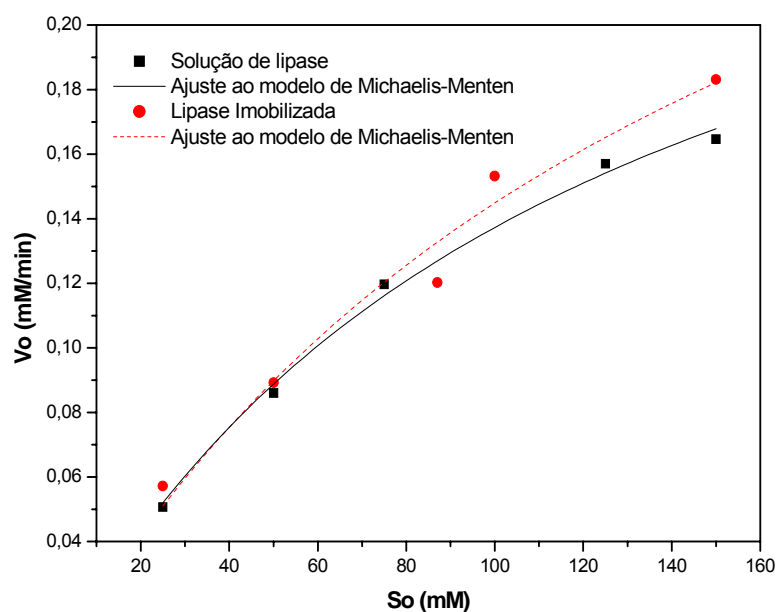
**Tabela 4.7:** Parâmetros do estudo de estabilidade térmica a 60°C da lipase imobilizada por adsorção a concentração inicial de enzima de 40 U/mL, para diferentes valores de pH do meio de imobilização.

Enzimas	$k_1$ ( $h^{-1}$ )	$k_2$ ( $h^{-1}$ )	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$t_{1/2}$ (h)	F
Derivado obtido em pH 7	0,811	0,0283	63,732	0	9,838	101,63
Derivado obtido em pH 5	0,521	0,0096	29,885	0	2,37	24,48
Derivado obtido em pH 4	0,503	0,0215	36,436	0	2,92	30,16

#### 4.2.5 Efeito da Concentração de Substrato na Velocidade de Hidrólise de Butirato de Metila Catalisada por Lipase

As velocidades da reação de hidrólise de butirato de metila catalisada por lipase em solução ou imobilizada variaram em função da concentração de substrato, conforme mostra a Figura 4.16, segundo o modelo cinético de Michaelis-Menten.

Assim, os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram calculados. A obtenção destes valores foi realizada por ajuste linear e não-linear do modelo de Lineweaver-Burk e Michaelis-Menten aos dados experimentais, respectivamente. Ainda referente à Figura 4.16, pode-se observar que a velocidade inicial de reação catalisada por lipase imobilizada é levemente maior para concentrações de substrato iguais ou superiores a 100 mM.



**Figura 4.16:** Influência da concentração de substrato na velocidade inicial de reação de hidrólise de butirato de metila, em pH 7,0 e temperatura ambiente, catalisada por lipase em solução e imobilizada em fibra de casca de coco verde.

Comparando os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  obtidos por ajuste não linear e por regressão linear (Tabela 4.8), considerando a faixa de erro experimental, verificou-se que a diferença entre eles não foi significativa. Também não se observou variação significativa entre os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para enzima em solução e para enzima imobilizada em fibra de coco. Tendo em vista que os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  são os mesmos, tanto para enzima em solução quanto para enzima imobilizada, conclui-se que a imobilização não influenciou na interação enzima-substrato. Alguns fatores como: imobilização na superfície da fibra, ausência de agente inibidor, biocompatibilidade do substrato e do solvente usado, ausência de partição, cargas equivalentes de enzima e parâmetros reacionais constantes (pH, temperatura e pressão) podem ter contribuído para que o valor de  $V_{m\acute{a}x}$  obtido fosse o mesmo.

Quanto à conservação de  $K_m$ , esta é resultado da ausência de mudanças na conformação do sítio ativo durante a imobilização da CAL B na fibra de coco verde. Considerando que a CAL B não sofre ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998), a conservação do valor de  $K_m$  para a enzima imobilizada é o melhor resultado a ser esperado no processo de imobilização desta lipase.

**Tabela 4.8:** Valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  de lipase tipo B de *C. antarctica* na forma solúvel e na forma imobilizada por adsorção em fibra de coco, obtidos por diferentes métodos.

Método utilizado	Livre		Imobilizada	
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM/min)
Ajuste Não-Linear	120,62 ± 15,42	0,3029 ± 0,021	158,93 ± 57,34	0,3752 ± 0,082
Gráfico de Lineweaver-Burk	145,67	0,3445	121,21	0,3264

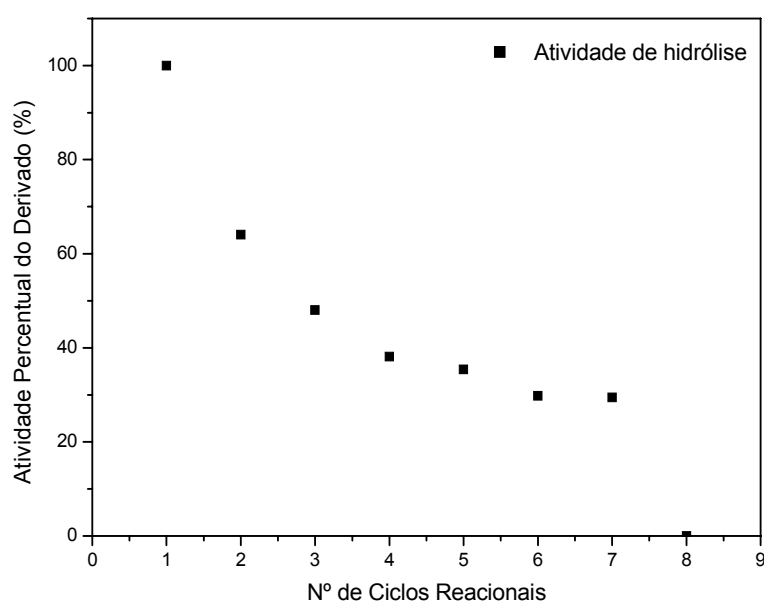
#### 4.2.6 Estabilidade da Enzima Imobilizada por Adsorção

Considerando os resultados obtidos até então com o estudo de concentração inicial de enzima, tempo de imobilização, valor de pH de imobilização e pH da superfície da fibra, selecionou-se um derivado para realizar estudos de estabilidade operacional e térmica. O derivado utilizado foi obtido após 2 horas de contato da fibra lavada (pH da superfície igual a 5) com uma solução de enzima contendo 40 U/mL, em tampão fosfato pH 7.

##### 4.2.6.1 Estabilidade operacional

A Figura 4.17 mostra o estudo de estabilidade operacional do derivado obtido por adsorção, utilizando como modelo reações subseqüentes de hidrólise de butirato de metila, a pH 7,0 e temperatura ambiente. Pôde-se observar uma desativação gradual e que o derivado apresentou atividade até o sétimo ciclo reacional de hidrólise. A queda abrupta observada após o sétimo ciclo é, provavelmente, devido à baixa atividade do derivado, que está no limite de detecção do método utilizado. Quando o derivado é submetido a um novo ciclo, não há como detectar qualquer atividade hidrolítica presente, sendo este valor considerado nulo. Comparando com dados obtidos por Dey, Nagpal e Banerjee (2002), para  $\alpha$ -amilase imobilizada por adsorção em fibra de coco maduro, a imobilização de  $\alpha$ -amilase mostrou-se mais eficiente do que a imobilização de lipase, quando submetidas a reações de hidrólise

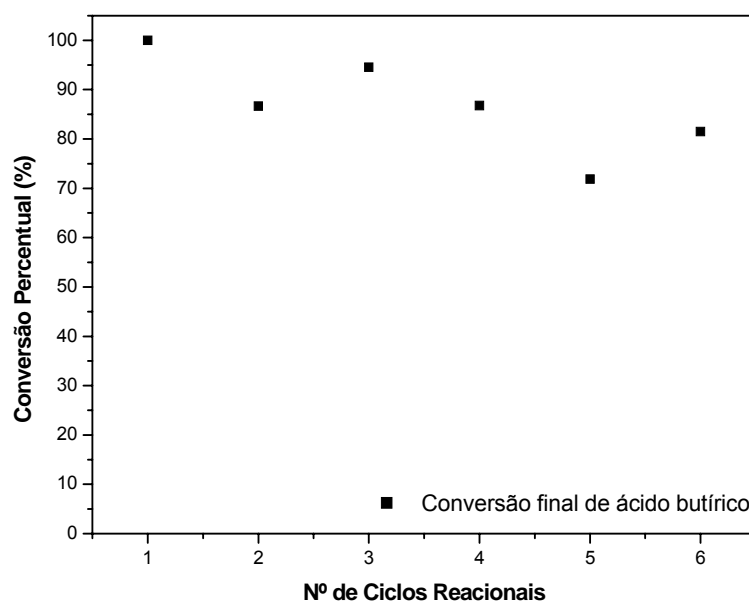
em meio aquoso, uma vez que tal derivado reteve maior quantidade de atividade durante os 5 primeiros ciclos, tendo um decréscimo linear de atividade. Segundo Zanin (1989), a estabilidade operacional de enzimas imobilizadas em suportes aniônicos e catiônicos é função da força iônica da solução. Logo, uma alternativa para melhorar a estabilidade operacional da lipase adsorvida em fibra é avaliar soluções de substratos preparadas com diferentes forças iônicas.



**Figura 4.17:** Perfil da estabilidade operacional de lipase imobilizada em fibra de coco por adsorção, a pH 7 e temperatura ambiente, baseado na hidrólise de butirato de metila.

A Figura 4.18 mostra o estudo de estabilidade operacional do derivado obtido por adsorção, utilizando como modelo reações subseqüentes de síntese de butirato de butila, a partir de concentrações equimolares de ácido butírico e butanol, em meio orgânico. Quando o derivado é submetido à reação de síntese, observou-se que, no quinto ciclo, o derivado manteve 71,9% do seu potencial catalítico inicial, podendo ser submetido a um número maior de ciclos frente à reação de hidrólise. Esta diferença de estabilidade frente ao tipo de reação catalisada se dá devido ao fato de que meios orgânicos, apesar de, em alguns casos, provocarem desativação por mudanças conformacionais, favorecem a permanência da enzima na forma adsorvida, aumentando, assim, a quantidade de ciclos possíveis.



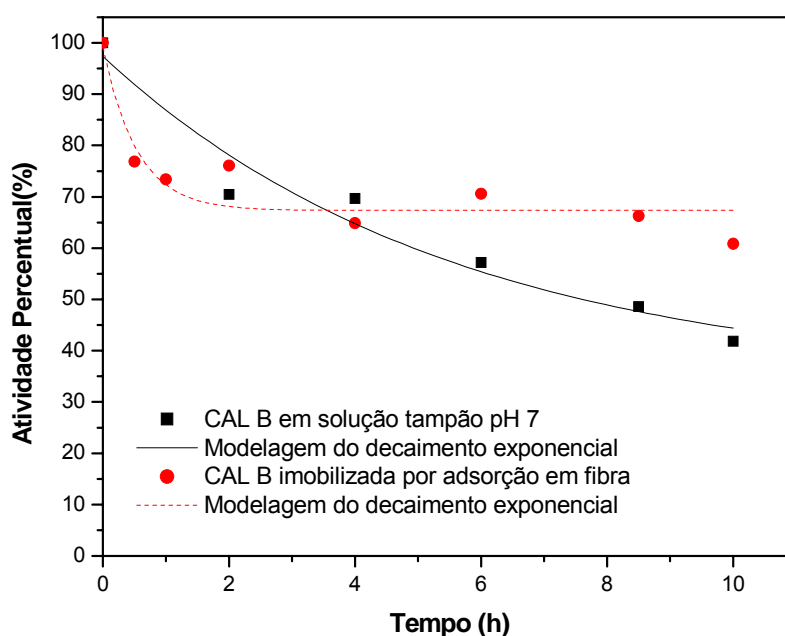


**Figura 4.18:** Perfil da estabilidade operacional de lipase imobilizada em fibra de coco por adsorção, a pH 7 e temperatura ambiente, baseado na síntese de butirato de n-butila, a partir de concentrações equimolares de ácido butírico e butanol, em meio orgânico.

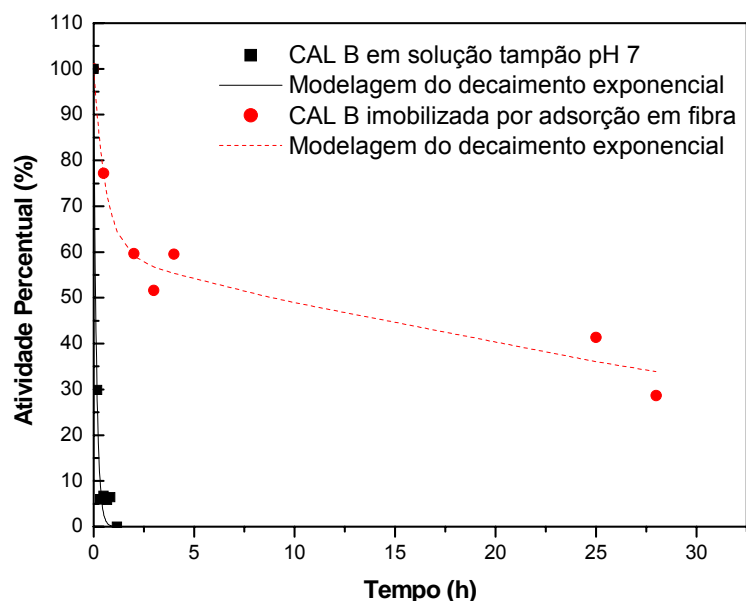
#### 4.2.6.2 Estabilidade térmica

Sabe-se que suportes hidrofílicos tendem a proteger a enzima contra desativação térmica devido a uma camada de água formada ao redor da enzima (ARROYO, SÁNCHEZ-MONTERO e SINISTERRA, 1999). Assim, devido ao efeito protetor do suporte, embora a imobilização de enzimas em fibra de coco se dê na sua superfície externa, espera-se uma maior estabilidade térmica frente à enzima solúvel em tampão. A Figura 4.19 mostra o perfil de desativação da lipase nas formas livre e imobilizada, quando submetida à temperatura de 50°C, em banho úmido. Verificou-se que até 4 horas, sob as dadas condições, as atividades percentuais da enzima livre e do derivado permaneceram praticamente iguais. Contudo, a partir de 6 horas, a enzima imobilizada mostrou-se mais estável. Embora mais estável, o perfil de desativação da enzima imobilizada por adsorção é igual ao da enzima livre. Isto se deve ao fato das enzimas estarem expostas na superfície da fibra. Tal fenômeno também pode ser observado com outros derivados cuja enzima imobilizada tem a mesma característica, por exemplo, o derivado comercial Novozym 435, CAL B imobilizada por adsorção em resina acrílica (ARROYO,

SANCHEZ-MONTERO e SINISTERRA, 1999). Já quando se avaliou a estabilidade térmica à 60°C, observou-se que a enzima em solução tampão teve um tempo de meia vida bastante curto, encontrando-se totalmente desativada em menos de uma hora e meia (Figura 4.20). Tal comportamento também foi observado por Blanco *et al.* (2004), sob as mesmas condições de temperatura e pH. Porém, a enzima, quando imobilizada, apresentou grande estabilidade, mantendo quase 27% da sua atividade inicial após 28 horas à 60°C. A lipase tipo B de *C. antarctica* imobilizada em fibra de coco verde por adsorção mostrou-se mais estável do que a imobilizada em sílica, haja vista que esta última, após 5 horas à 60°C, possuía menos de 20% da sua atividade inicial (BLANCO *et al.*, 2004).



**Figura 4.19:** Perfil de desativação térmica a 50°C de lipase tipo B de *C. antarctica* na forma solúvel e imobilizada em fibra de coco verde por adsorção.



**Figura 4.20:** Perfil de desativação térmica a 60°C de lipase tipo B de *C. antarctica* na forma solúvel e imobilizada em fibra de coco verde por adsorção.

Com base nos gráficos obtidos, considerou-se decaimento exponencial simples para os perfis a 50°C e para o perfil de enzima solúvel a 60°C e decaimento exponencial duplo para o perfil de enzima imobilizada a 60°C. A Tabela 4.9 apresenta os valores das constantes de desativação térmica ( $k_1$  e  $k_2$ ), o tempo de meia vida aparente ( $t_{1/2}$ ) e o fator de estabilidade obtidos para as enzimas livre e imobilizada. O fator de estabilização ( $F$ ), que é a razão entre os tempos de meia vida da enzima imobilizada e livre, para a imobilização em fibra de coco, frente à temperatura de 50°C, foi de 2,07, um pouco maior do que o observado na imobilização em suporte microporoso hidrofóbico (carvão ativado), 1,67 (RODRIGUES *et al.*, 2004). Considerando que, em ambos os casos, a imobilização ocorre, principalmente, na superfície externa do suporte, tem-se que o caráter hidrofílico da fibra – responsável pela formação de uma camada de água ao redor da enzima – promove um leve aumento na estabilidade térmica, quando comparada com a da imobilização em carvão ativado. Na temperatura de 60°C, devido à baixa estabilidade da enzima em solução a tal temperatura, obteve-se um alto fator de estabilização, o que mostra, inclusive pela diferença de perfil de desativação, que as forças iônicas presentes neste processo de adsorção junto ao caráter hidrofílico da fibra promoveram maior estabilidade à enzima.

**Tabela 4.9:** Parâmetros cinéticos da desativação térmica da lipase tipo B de *C. antarctica* a 50° e 60°C.

Enzimas	$k_1$ (h <sup>-1</sup> )	$k_2$ (h <sup>-1</sup> )	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$t_{1/2}$ (h)	F
Solução de lipase a 50°C	0,0791	-	4,53	-	7,813	1
Solução de lipase a 60°C	7,153	-	99,908	-	0,0968	1
Lipase imobilizada a 50°C	0,0309	-	4,412	-	16,180	2,07
Lipase imobilizada a 60°C	1,642	0,0204	59,236	0	8,92	92,15

### 4.3 IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE

A imobilização por ligação covalente é resultado da reação de um grupamento funcional do suporte com um grupamento presente na enzima. Dependendo do grupamento disponível no suporte, a ligação pode ocorrer com os grupos aminas, hidroxilas e/ou tióis da enzima (ARROYO, SÁNCHEZ-MONTERO e SINISTERRA, 1999). No caso de compostos organosilanos, como citado anteriormente no capítulo de materiais e métodos, a reação se dá através dos grupamentos aldeídicos e aminas formando bases de Schiff. Dentre alguns fatores que afetam a ocorrência e a estabilidade desta reação encontra-se o pH do meio, a concentração de enzimas e o tempo de imobilização. Assim, com o intuito de avaliar a influência desses fatores no processo de imobilização, lipase tipo B de *C. antarctica* foi imobilizada em fibra de coco verde por ligação covalente sob diferentes condições.

#### 4.3.1 Pré-Tratamento da Fibra com Hexano

O pré-tratamento da fibra com hexano foi avaliado antes, durante e após o processo de imobilização, sendo comparado com a imobilização na ausência deste solvente. Um derivado controle, sem hexano, também foi obtido na presença de polietilenoglicol (PEG), a fim de avaliar a sua influência no processo de imobilização.

##### 4.3.1.1 Pré-tratamento da fibra com hexano antes do processo de imobilização

O derivado obtido com o uso de hexano antes da imobilização apresentou valores menores de atividade hidrolítica, atividade recuperada, conversão de ácido butírico e atividade de síntese quando comparado aos derivados obtidos na

ausência de hexano, apesar de ter-se observado um maior rendimento de imobilização (Tabela 4.10). Já a presença de PEG no processo de imobilização favoreceu a atividade do derivado, tanto para a reação de hidrólise quanto para a de síntese, tendo-se observado ainda um maior rendimento de imobilização na sua presença.

**Tabela 4.10:** Parâmetros de imobilização para lipase tipo B de *C. antarctica*, imobilizada em fibra de coco verde sob diferentes condições. Condição 1: Fibra tratada com hexano e CAL B imobilizada na presença de PEG. Condição 2: Fibra sem tratamento com hexano e CAL B imobilizada na presença de PEG. Condição 3: Fibra sem tratamento com hexano e CAL B imobilizada na ausência de PEG.

Parâmetros	Condição de imobilização		
	1	2	3
Atividade hidrolítica do derivado (U/g)	23,33	41,41	28,73
Atividade recuperada (%)	15,9	36,5	49,6
Rendimento de imobilização (%)	46,1	35,6	18
Atividade de esterificação (U/g)	8,07	12,68	5,39
Conversão de ácido butírico (%)	58,67	86,67	81,25

4.3.1.2 Pré-tratamento da fibra com hexano durante o processo de imobilização

Com o objetivo de se avaliar o pré-tratamento com hexano durante o processo de imobilização e tendo como referência a metodologia proposta por Castro, Lima e Roberto (2001), após duas horas de imobilização de CAL B – L2 em fibra pré-tratada com hexano, 10 mL de hexano foram adicionados ao sistema, que foi mantido sob agitação por mais 15 horas a 8°C. Ao fim deste processo, o derivado apresentou uma perda de 20% da sua atividade hidrolítica. A presença de hexano durante este período de 15 horas pode ter promovido a imobilização da enzima com uma conformação desfavorável a hidrólise, ocasionando esta perda em sua atividade hidrolítica.

Considerando que a lipase tipo B de *C. antarctica* é uma das poucas lipases que não sofre o fenômeno de ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998), a

presença da interface óleo/água durante o processo de imobilização não promove uma hiper-ativação da mesma, o que foi constatado por Foresti e Ferreira (2005). Todavia, a presença desta interface pode reduzir o fenômeno de aglomeração do biocatalizador, observado em alguns sistemas, permitindo uma relação linear entre a quantidade do derivado e o rendimento da reação (FORESTI e FERREIRA, 2005). Porém, em vista a obtenção de conversão de ácido maior que 70% para derivados obtidos sem qualquer pré-tratamento, a presença de tal fenômeno para o sistema lipase/fibra foi desprezada.

#### 4.3.1.3 Pré-tratamento da fibra com hexano após o processo de imobilização

Quando se realizou uma lavagem com hexano após o processo de imobilização, sem pré-tratamento, observou-se um aumento não significativo na atividade de esterificação e uma redução não significativa na conversão de ácido butírico, ver Tabela 4.11, mostrando que tal lavagem pouco influenciou o desempenho da lipase imobilizada na síntese de butirato de butila. Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha, Gil e Garcia (1998) quando avaliaram o pré-tratamento com hexano em lipase de *Mucor miehei* imobilizada em polietileno-g-co-hidroxietilmetacrilato (PE-g-co-HEMA).

**Tabela 4.11:** Influência da lavagem com hexano do derivado, após imobilização, nos parâmetros de síntese de butirato de butila.

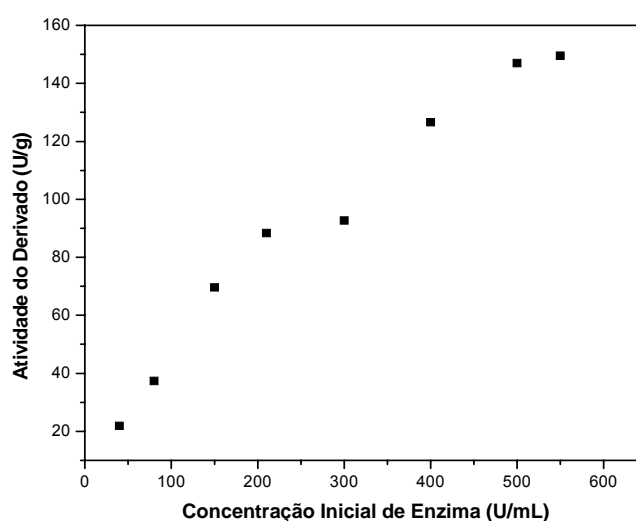
Tratamento	Atividade de esterificação (U/g)	Conversão (%)
Lavagem com tampão	8,07	87,33
Lavagem com tampão e hexano	9,22	85,91

Assim, o emprego do pré-tratamento do derivado com hexano após a imobilização se mostrou desnecessário, haja vista que a influência observada pode ser desprezada. Quando o tratamento foi realizado anteriormente ao processo de imobilização ou durante o processo, observou-se uma redução da atividade catalítica. Isto mostra que, devido às características do sistema estudado, o pré-tratamento com hexano propicia a formação de derivados com menor potencial catalítico de hidrólise, sendo seu uso inadequado para o sistema em estudo.

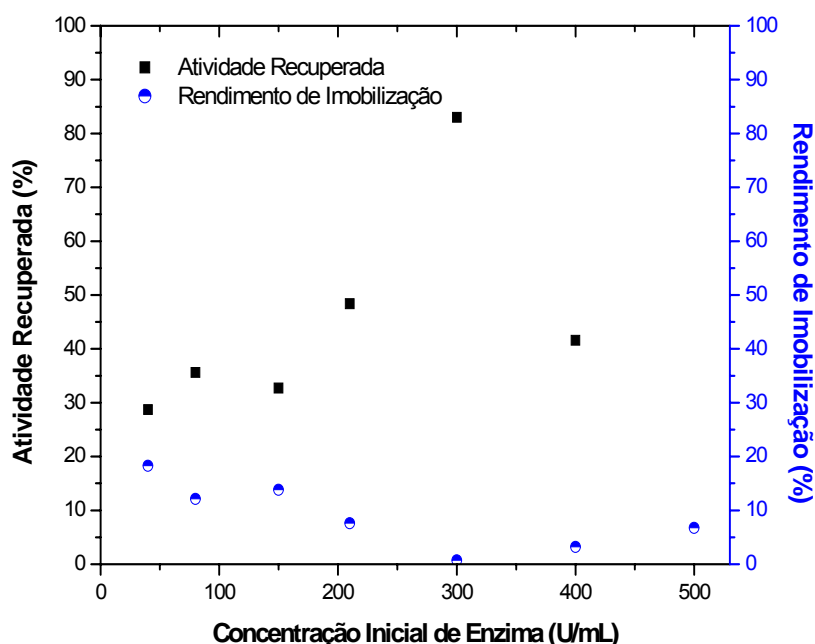
### 4.3.2 Estudo da Carga Máxima de Enzima

A fim de se avaliar a carga máxima de enzima que pode ser imobilizada em fibra de coco verde funcionalizada com GPTMS, realizaram-se ensaios de imobilização para diferentes concentrações iniciais de CAL B no sobrenadante, dadas em U/mL. Conforme mostra a Figura 4.21, a atividade medida no derivado foi diretamente proporcional à quantidade de enzima inicial oferecida até aproximadamente 220 U/mL. Para concentrações acima deste valor, observa-se uma tendência à saturação do suporte.

Em paralelo, semelhante ao observado na imobilização por adsorção (Figura 4.10), tem-se uma redução do rendimento e um leve aumento na atividade recuperada com o aumento da concentração inicial de enzima oferecida para imobilização (Figura 4.22). Novamente, reporta-se o erro destas medidas para concentrações iguais ou maiores que 150 U/mL devido à baixa área superficial do suporte, não havendo, portanto, diferença considerável nos valores de atividade da solução de enzima em contato com o suporte antes e após um dado tempo de imobilização. Tal comportamento é bem diferente do encontrado em suportes com maior área superficial, a exemplo, Rodrigues (2005), quando estudou a imobilização de CAL B em quitosana por ligação covalente, observou que para concentrações iniciais iguais ou maiores do que 400 U/mL, a atividade no derivado permaneceu constante e a atividade recuperada foi menor.



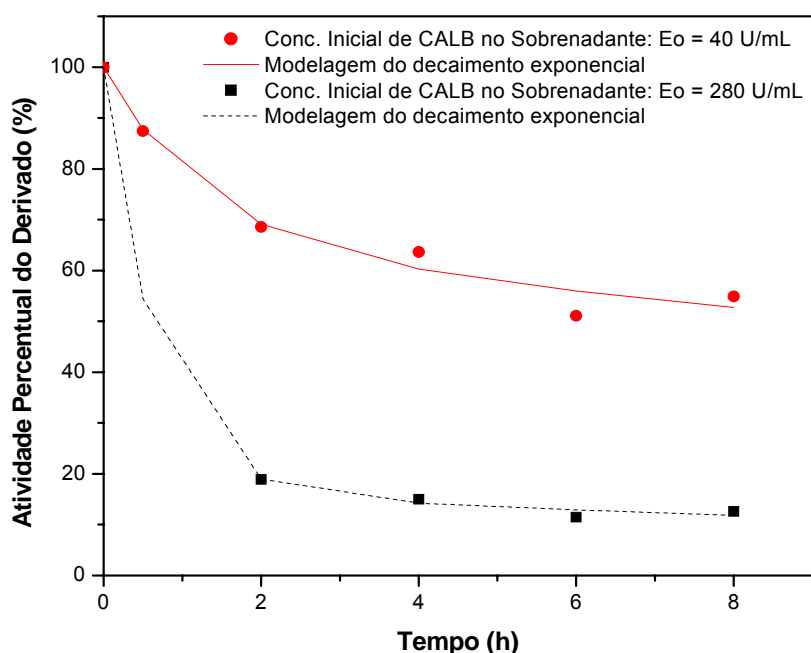
**Figura 4.21:** Atividade do derivado obtido a partir da imobilização de diferentes concentrações iniciais de enzima em fibra de coco por ligação covalente a pH 7.



**Figura 4.22:** Atividade recuperada e rendimento de imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco verde por ligação covalente em pH 7 para diferentes concentrações iniciais de enzima.

Arroyo, Sánchez-Montero e Sinisterra (1999), quando imobilizaram lipase tipo B de *C. antarctica* por ligação covalente tanto em suporte orgânico quanto inorgânico, observaram a formação de multicamadas ao aumentarem a quantidade de enzima disponível para imobilização. Para avaliar a presença de multicamadas na imobilização de CAL B em fibra funcionalizada, submeteu-se um derivado – o qual foi obtido a partir da imobilização em pH 7 de CAL B – L2 (280 U/mL), a temperatura ambiente, por um período de duas horas – ao estudo de estabilidade térmica a 60°C e sua estabilidade foi comparada com a do derivado obtido a partir de imobilização com solução de lipase tipo B de *C. antarctica* contendo 40 U/mL. A Figura 4.23 mostra claramente uma queda mais acentuada da atividade do derivado, confirmada pela diferença nas taxas de atividades específicas ( $\alpha_1$ ), 63,73 e 16,33, para imobilização com concentração inicial de 40 U/mL e 280 U/mL, respectivamente (Tabela 4.12). Essa diferença de atividade no estado intermediário E<sub>1</sub>, também observada por Arroyo, Sánchez-Montero e Sinisterra (1999), indica a formação de multicamadas no derivado obtido por imobilização a partir de uma concentração inicial de enzima de 280 U/mL.





**Figura 4.23:** Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco por ligação covalente, a pH 7, para diferentes concentrações iniciais de enzima.

**Tabela 4.12:** Parâmetros cinéticos de desativação térmica a 60°C da lipase imobilizada por ligação covalente em fibra de coco funcionalizada, a pH 7, a diferentes concentrações iniciais de enzima.

Enzimas	$k_1$ ( $h^{-1}$ )	$k_2$ ( $h^{-1}$ )	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$t_{1/2}$ (h)	F
Solução de lipase a 60°C	7,153	-	99,908	-	0,0968	1
Derivado c/ Eo = 40 U/mL	0,811	0,0283	63,732	0	9,838	101,63
Derivado c/ Eo = 280 U/mL	1,57	0,0438	16,333	0	0,577	5,96

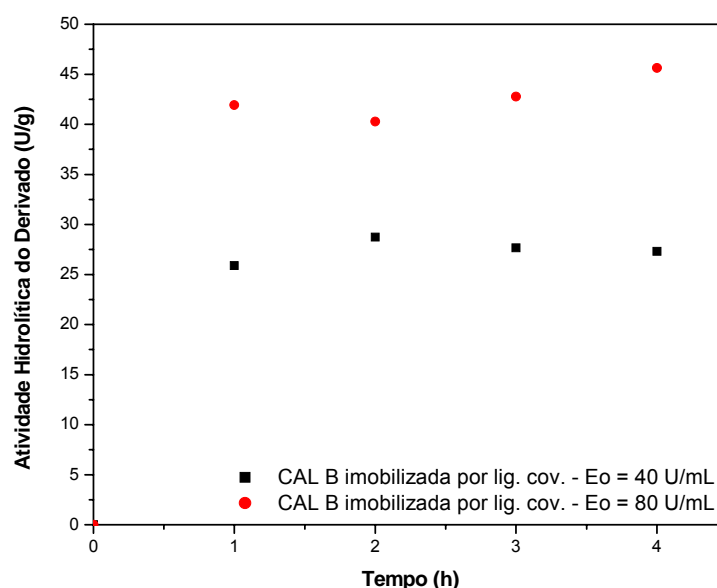
A carga de enzima oferecida para imobilização por ligação covalente influencia diretamente o derivado obtido. Cargas muito elevadas tendem a reduzir a estabilidade do derivado obtido, haja vista que há uma redução na quantidade de ligações realizadas para cada enzima. Contudo, cargas muito baixas tendem a promover derivados de baixa atividade enzimática, devido às inúmeras ligações feitas em apenas uma enzima (HERNAIZ e CROUT, 2000). Assim, para se avaliar a influência da concentração de enzimas na quantidade de ligações formadas, deve-se realizar experimentos de carga máxima a pH 10. Haja vista que, a pH 7, a

quantidade de ligações covalentes é restrita devido a pouca quantidade de grupos aminas disponíveis para imobilização.

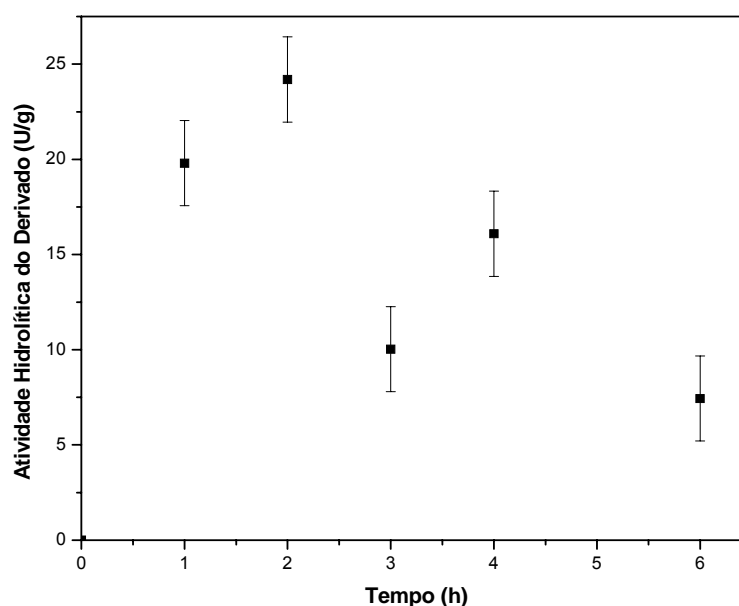
### 4.3.3 Influência do pH de Imobilização nas Propriedades do Biocatalisador

#### 4.3.3.1 Influência do tempo de contato enzima-suporte na imobilização por ligação covalente

O processo de imobilização da CAL B – L2 em fibra de coco por ligação covalente foi acompanhado por um período de 4 horas, tanto a pH 7 (solução inicial de enzima contendo 40 U/mL e 80 U/mL) quanto a pH 10 (solução inicial de enzima contendo 80 U/mL). Após 2 horas de imobilização a pH 7, a atividade hidrolítica do derivado permaneceu praticamente a mesma (Figura 4.24). Enquanto que a pH 10, entre 1 e 2 horas de imobilização, observaram-se valores próximos de atividade hidrolítica no derivado, caindo em, aproximadamente, 50% após 3 horas de imobilização (Figura 4.25). Tal queda se deu, provavelmente, devido à formação de uma maior quantidade de bases de Schiff entre a enzima e o suporte, que, estando imobilizada de forma mais rígida ao suporte, perdeu um pouco da sua capacidade catalítica. Um estudo da estabilidade térmica do derivado obtido após 3 horas de imobilização deve ser realizado a fim de confirmar tal hipótese.



**Figura 4.24:** Atividade hidrolítica no derivado após um dado tempo de imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco por ligação covalente a pH 7.



**Figura 4.25:** Atividade hidrolítica no derivado após um dado tempo de imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco por ligação covalente a pH 10 ( $E_0 = 80$  U/mL).

Considerando que o tempo de contato é um fator importante na formação de ligações multipontuais, já que após a primeira ligação nem sempre a enzima está corretamente alinhada para novas ligações (BLANCO, CALVETE e GUIÁN, 1989), faz-se necessário avaliar tempos maiores de imobilização a pH 10, a fim de favorecer o alinhamento da enzima.

Comparando a imobilização a pH 7 com a realizada a pH 10, para um tempo de contato de 2 horas e concentração inicial de enzima no sobrenadante igual a 80 U/mL, observou-se maior atividade hidrolítica e maior rendimento quando a imobilização foi realizada a pH 7 (Tabela 4.13). Outros autores (OTERO, BALLESTEROS e GUIÁN, 1988; PALOMO *et al.*, 2002; PALOMO *et al.*, 2003b) reportaram queda na atividade de enzimas imobilizadas por ligações multipontuais devido, dentre outros fatores, a uma maior rigidez proporcionada à enzima. No presente trabalho, supõe-se que a baixa atividade hidrolítica observada no derivado obtido a pH 10 impediu uma melhor avaliação do derivado quanto à estabilidade térmica e operacional. Esta atividade hidrolítica baixa ocorreu devido a um maior número de ligações formadas entre a enzima e o suporte e a pequena quantidade de grupos no suporte disponível para promover estas ligações.

**Tabela 4.13:** Valores de atividade hidrolítica do derivado, atividade recuperada e rendimento de imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente em pH 7 e pH 10.

Parâmetros de Imobilização	pH 7	pH 10
Atividade do derivado (U/g)	40,28	6,46
Atividade recuperada (%)	20,51	77,8
Rend. de imobilização (%)	20,69	2,6

#### 4.3.3.2 Efeito da presença de aditivos

Buscando a obtenção de um derivado mais ativo tanto em reações de hidrólise quanto em reações de síntese, estudou-se, através de um planejamento fatorial  $2^3$ , o efeito da concentração inicial de enzima ( $X_1$ ), presença de PEG 6.000 ( $X_2$ ) e presença de ácido butírico ( $X_3$ ) na imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco por ligação covalente a pH 7 e 10. As variáveis respostas selecionadas para este planejamento foram atividade hidrolítica do derivado ( $R_1$ ) e conversão de ácido butírico ( $R_2$ ).

A Tabela 4.14 mostra os resultados do planejamento fatorial obtidos para as duas respostas da imobilização a pH 7. A maior atividade de hidrólise (37,37 U/g) foi alcançada quando se realizou o experimento com maior carga enzimática, sem a presença de PEG e sem a presença de ácido butírico. Quanto aos valores de conversão de ácido butírico, a maior conversão após 24 horas de reação (93,90%) foi alcançada quando se realizou o experimento com maior carga enzimática, sem a presença de PEG e com a presença de ácido butírico a 230 mM. Além disso, o derivado obtido no ensaio 5 foi responsável pela maior atividade hidrolítica e a segunda maior conversão dentro da faixa estudada.

Utilizando o programa Statistica versão 6.0, empregou-se a técnica da Análise de Variância (ANOVA) na análise dos resultados a fim de se determinar quais os modelos seriam utilizados de forma a obter o melhor ajuste aos dados experimentais frente às duas variáveis respostas.

Selecionou-se um modelo linear para realizar o ajuste dos resultados experimentais dos valores de atividade hidrolítica dos derivados obtidos a partir da imobilização por ligação covalente a pH 7. A Tabela 4.15 mostra os efeitos das variáveis estudadas, calculados considerando diferentes tipos de interação entre as variáveis.

**Tabela 4.14:** Atividade hidrolítica ( $R_1$ ) e conversão de ácido butírico ( $R_2$ ) do derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 7 e temperatura ambiente, utilizando diferentes concentrações iniciais de enzima ( $X_1$ ), de PEG 6.000 ( $X_2$ ) e de ácido butírico ( $X_3$ ) no sobrenadante.

Experimentos	Variável			Resposta	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$R_1$ (U/g)	$R_2$ (%)
1	-1	-1	-1	21,88	91,71
2	-1	-1	+1	25,26	92,53
3	-1	+1	-1	26,38	90,07
4	-1	+1	+1	33,67	87,95
5	+1	-1	-1	37,37	92,60
6	+1	-1	+1	36,87	93,90
7	+1	+1	-1	29,67	89,73
8	+1	+1	+1	35,70	91,78
9	0	0	0	35,13	89,79
10	0	0	0	34,20	88,63

**Tabela 4.15:** Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^3$  tendo como resposta a atividade hidrolítica do derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 7.

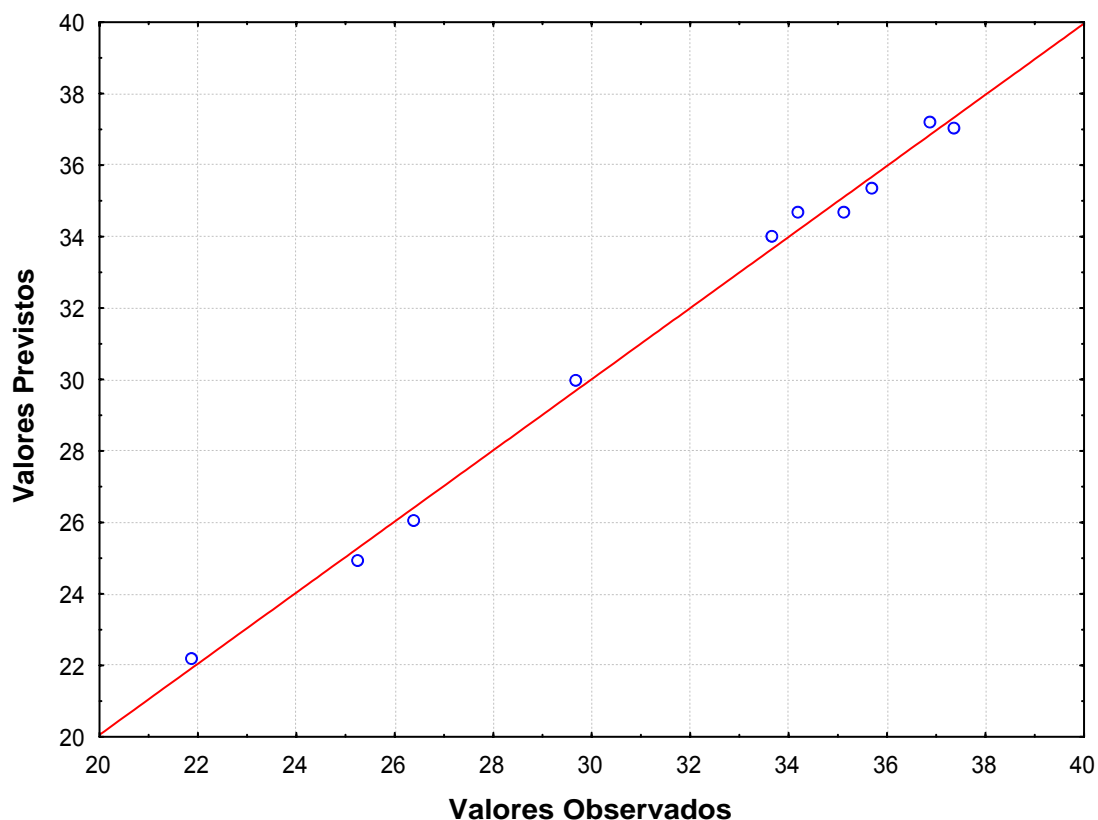
Média	30,85 ± 0,2
Efeitos principais:	
(Concentração inicial de enzima) $X_1$	8,11 ± 0,5
(Concentração inicial de PEG 6.000) $X_2$	1,01 ± 0,5
(Concentração inicial de ácido butírico) $X_3$	4,05 ± 0,5
Interações de dois fatores:	
$X_1 X_2$	-5,44 ± 0,5
$X_1 X_3$	-1,29 ± 0,5
$X_2 X_3$	2,61 ± 0,5
Interações de três fatores:	
$X_1 X_2 X_3$	0,65 ± 0,5

Uma análise das tabelas de ANOVA e dos gráficos dos resíduos (Apêndice D) mostrou que o modelo com duas interações foi o que apresentou menor média

quadrática residual (8,19) e explica 99,52% da variância. Para este modelo, apenas a variável concentração inicial de enzimas ( $X_1$ ) se mostrou estatisticamente significativa na atividade hidrolítica, com um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). A Equação 4.3 expressa o modelo estudado, no qual as variáveis apresentam os valores codificados, representando a atividade hidrolítica ( $R_1$ ) como função da concentração inicial de enzima ( $X_1$ ).

$$R_1 = (30,85 \pm 0,2) + (4,05 \pm 0,2)X_1 \quad (4.3)$$

A Figura 4.26 mostra o gráfico dos valores previstos em função dos valores obtidos. Pode-se confirmar que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais.



**Figura 4.26:** Gráfico de dispersão entre a saída esperada (valor experimental) e a fornecida pelo modelo linear proposto para o estudo da influência de três variáveis na imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente a pH 7 tendo como variável resposta a atividade hidrolítica do derivado obtido.

Para a variável resposta conversão de ácido butírico, pôde-se observar que um modelo linear foi suficiente para ajustar os dados. A Tabela 4.16 mostra os

efeitos das variáveis estudadas, calculados considerando diferentes tipos de interação entre as variáveis.

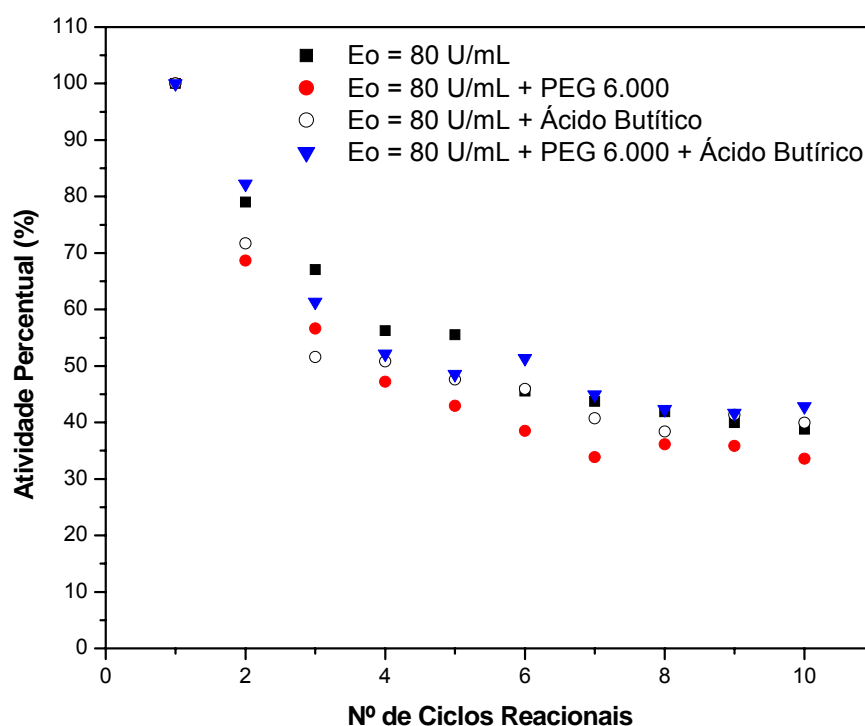
**Tabela 4.16:** Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^3$  tendo como resposta a conversão de ácido butírico pelo derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 7.

Média	91,28 ± 0,2
Efeitos principais:	
(Concentração inicial de enzima) $X_1$	1,44 ± 0,6
(Concentração inicial de PEG 6.000) $X_2$	-2,80 ± 0,6
(Concentração inicial de ácido butírico) $X_3$	0,51 ± 0,6
Interações de dois fatores:	
$X_1 X_2$	0,31 ± 0,6
$X_1 X_3$	1,16 ± 0,6
$X_2 X_3$	-0,55 ± 0,6
Interações de três fatores:	
$X_1 X_2 X_3$	0,92 ± 0,6

Analisando as tabelas de ANOVA e os gráficos dos resíduos (Apêndice D), observou-se que os três modelos avaliados apresentaram médias quadráticas residuais próximas. Contudo, o modelo com três interações foi o que mostrou maior  $R^2$ , explicando 97,97% da variância. Para este modelo, não houve influência significativa das variáveis estudadas sobre a resposta conversão de ácido butírico ( $R_2$ ). Apesar de ser esperada a influência da concentração inicial de enzima, esta não foi observada devido ao fato de que, mesmo para a menor concentração de enzima no derivado, o valor de conversão já é bastante elevado, sendo sem significância estatística o leve aumento na conversão provocado pelo aumento da concentração de enzima.

Em seguida ao planejamento fatorial, realizou-se estudo de estabilidade operacional de hidrólise dos derivados obtidos nas condições dos ensaios 5 a 8. Os

resultados mostraram que o uso dos aditivos, além de não promover variações significativas no potencial catalítico dos derivados obtidos, também não influenciaram na estabilidade operacional destes, sendo a diferença entre os perfis de desativação não significativa (Figura 4.27). Considerando que a imobilização por ligação covalente a pH 7 se dá de forma unipontual, era de se esperar que a presença de aditivos, em especial o ácido butírico, não influenciasse significativamente na imobilização da CAL B em fibra de coco.



**Figura 4.27:** Estabilidade operacional de hidrólise de butirato de metila, a pH 7,0 e temperatura ambiente, catalisada por lipase tipo B de *C. antarctica* imobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 7, na ausência ou presença de diferentes aditivos.

A Tabela 4.17 mostra os resultados dos estudos de imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco por ligação covalente a pH 10. Para a variável resposta 1, atividade de hidrólise do derivado, observou-se que os valores obtidos durante o planejamento variaram entre 7,53 e 14,76 U/g, enquanto que, para a variável resposta 2, observaram-se valores entre 25,66% e 52,18%.



**Tabela 4.17:** Atividade hidrolítica ( $R_1$ ) e conversão de ácido butírico ( $R_2$ ) do derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 10, para diferentes concentrações iniciais de enzima ( $X_1$ ), de PEG 6.000 ( $X_2$ ) e de ácido butírico ( $X_3$ ) no sobrenadante.

Experimentos	Variável			Resposta	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$R_1$ (U/g)	$R_2$ (%)
1	- 1	- 1	- 1	9,03	26,09
2	- 1	- 1	+ 1	9,99	31,89
3	- 1	+ 1	- 1	7,53	27,54
4	- 1	+ 1	+ 1	8,22	26,09
5	+ 1	- 1	- 1	12,32	47,83
6	+ 1	- 1	+ 1	11,66	47,83
7	+ 1	+ 1	- 1	13,83	52,18
8	+ 1	+ 1	+ 1	23,08	40,58
9	0	0	0	12,13	25,66
10	0	0	0	14,76	31,93

Novamente, fez-se uso do programa Statistica como ferramenta na análise dos resultados a fim de determinar quais os modelos seriam utilizados de forma a obter o melhor ajuste aos dados experimentais frente às duas variáveis respostas.

As Tabelas 4.18 e 4.19 mostram os efeitos das variáveis estudadas sobre a atividade hidrolítica e sobre a conversão de ácido butírico, respectivamente. Os efeitos foram calculados considerando diferentes tipos de interação entre as variáveis.

**Tabela 4.18:** Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^3$  tendo como resposta a atividade hidrolítica do derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 10.

Média	12,26 ± 0,6
Efeitos principais:	
(Concentração inicial de enzima) $X_1$	6,53 ± 1,3
(Concentração inicial de PEG 6.000) $X_2$	2,41 ± 1,3
(Concentração inicial de ácido butírico) $X_3$	2,56 ± 1,3

**Tabela 4.18:** Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^3$  tendo como resposta a atividade hidrolítica do derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 10 (Continuação).

Interações de dois fatores:	
$X_1 X_2$	$4,05 \pm 1,3$
$X_1 X_3$	$1,73 \pm 1,3$
$X_2 X_3$	$2,41 \pm 1,3$
Interações de três fatores:	
$X_1 X_2 X_3$	$2,54 \pm 1,3$

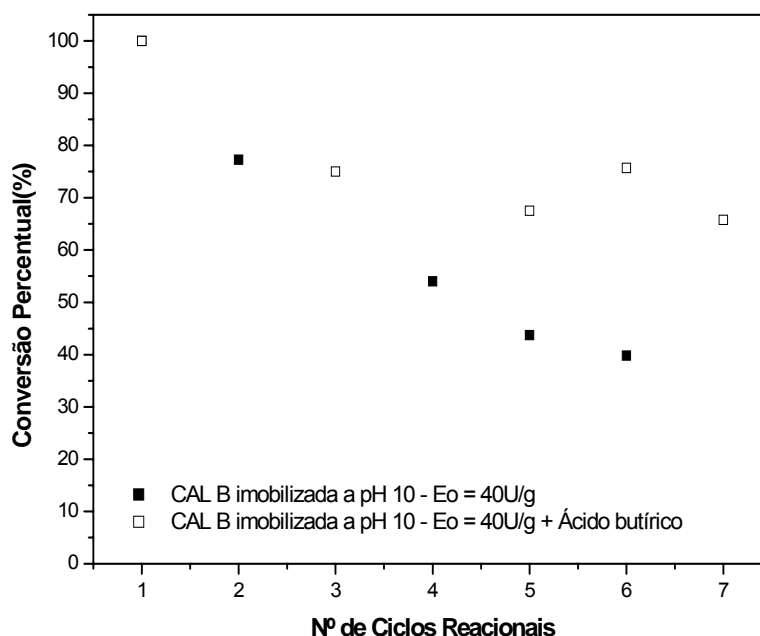
**Tabela 4.19:** Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^3$  tendo como resposta a conversão de ácido butírico pelo derivado obtido através da imobilização de lipase em fibra de coco por ligação covalente, em tampão pH 10.

Média	$35,76 \pm 1,4$
Efeitos principais:	
(Concentração inicial de enzima) $X_1$	$19,20 \pm 3,1$
(Concentração inicial de PEG 6.000) $X_2$	$-1,81 \pm 3,1$
(Concentração inicial de ácido butírico) $X_3$	$-1,81 \pm 3,1$
Interações de dois fatores:	
$X_1 X_2$	$0,36 \pm 3,1$
$X_1 X_3$	$-3,99 \pm 3,1$
$X_2 X_3$	$-4,71 \pm 3,1$
Interações de três fatores:	
$X_1 X_2 X_3$	$-1,09 \pm 3,1$

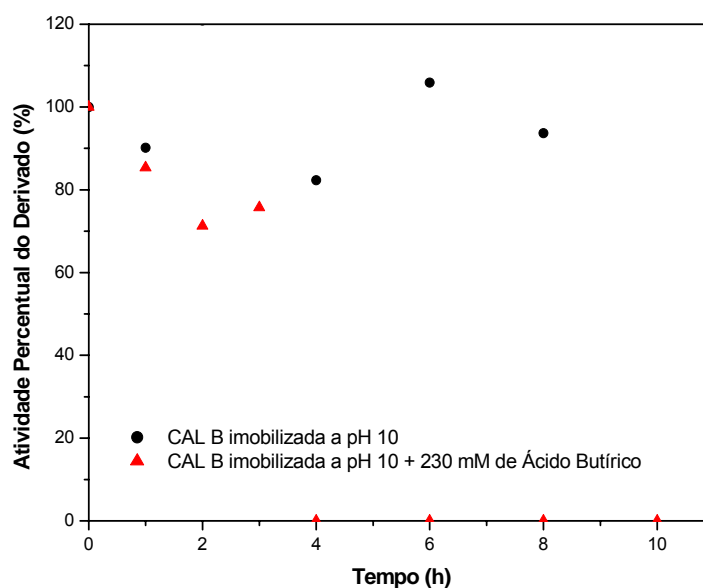
As tabelas de ANOVA e os gráficos dos resíduos (Apêndice D) obtidos para este estudo mostraram que, para a variável resposta atividade hidrolítica ( $R_1$ ), o modelo linear com três interações apresentou média quadrática residual de 3,50, explicando 98,08% da variância. Para este modelo, não houve influência significativa das variáveis estudadas sobre a resposta atividade hidrolítica ( $R_1$ ). Apesar de ser

esperada a influência da concentração inicial de enzima, esta não foi observada devido à pequena faixa de concentração usada e à baixa carga de enzima imobilizada a pH 10. Quanto a variável resposta conversão de ácido butírico ( $R_2$ ), a menor média quadrática encontrada foi de 36,64 para o modelo sem interações. O elevado valor de erro puro (19,65) mostra que o modelo linear não é ajustável para esta variável resposta, sendo seu uso inconclusivo.

Considerando que o uso de ácido butírico pode exercer efeitos sobre a estabilidade da enzima imobilizada, realizou-se estudo de estabilidade operacional de síntese e estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir das corridas 1 e 2 do planejamento fatorial para imobilização a pH 10. Os resultados mostraram que a presença de ácido butírico durante a imobilização a pH 10 promoveu maior estabilidade operacional de síntese (Figura 4.28), contudo, observou-se grande instabilidade térmica pra enzima imobilizada, estando a mesma totalmente desativada após 3 horas de incubação em tampão fosfato 0,1 M pH 7 a 60°C (Figura 4.29).



**Figura 4.28:** Estabilidade operacional de lipase do tipo B de *C. antarctica* imobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 10, na presença de ácido butírico, avaliada através de ciclos subseqüentes de síntese de butirato de butila em meio orgânico a 30°C.



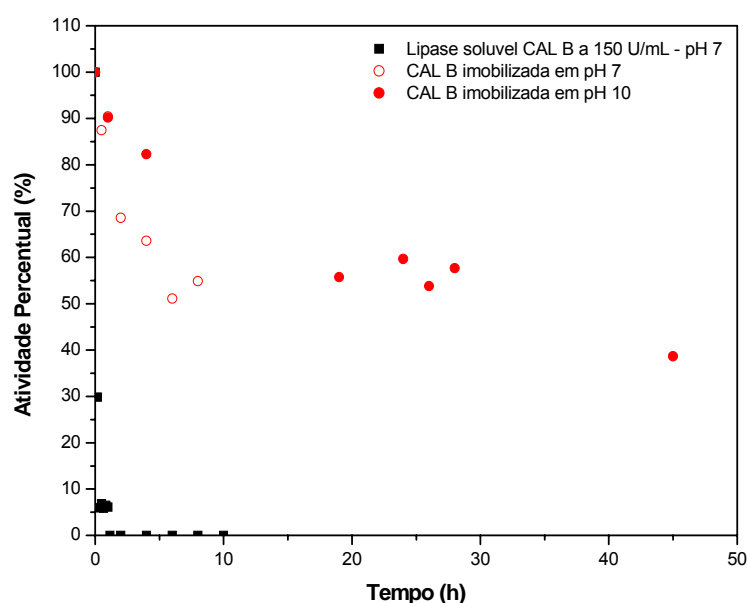
**Figura 4.29:** Estabilidade térmica a 60°C da lipase tipo B de *C. antarctica* imobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 10, na presença de ácido butírico.

Apesar do uso de PEG durante a imobilização se mostrar satisfatório para algumas enzimas estudadas por outros autores (VILLENEUVE *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2003) e, no caso específico da lipase tipo B de *C. antarctica* (CAL B), este mostrar-se eficiente como agente protetor durante processos de liofilização (SECUNDO *et al.*, 2001), alguns estudos tem reportado que a presença de PEG 6.000 não influencia significativamente no processo de imobilização da CAL B (BLANCO *et al.*, 2004; RODRIGUES, 2005). Em paralelo, sabe-se que o tipo de aditivo, sua concentração e o tempo de contato são parâmetros críticos que tem de ser otimizado em cada sistema em estudo (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998). Assim, presume-se que ou o efeito provocado pela presença de PEG 6.000 não é significativo frente à estabilidade da enzima imobilizada ou o peso molecular e/ou a quantidade adicionada não são compatíveis com o sistema estudado. Além disso, sabendo-se que tanto este trabalho quanto os realizados por Blanco *et al.* (2004) e Rodrigues (2005) foram realizados a partir de solução bruta de CAL B. Outra hipótese a ser considerada, neste caso, é que as impurezas inertes presentes nas soluções desta enzima bruta realizem o papel de um aditivo, de forma que a presença de aditivos no meio não promova benefícios adicionais no processo de imobilização (ROCHA, GIL e GARCIA, 1998).

A presença de substrato ou um inibidor durante o processo de imobilização a pH 10, que é quando se verifica a ocorrência de imobilização multipontual, pode exercer efeito protetor sobre o sítio ativo da enzima a ser imobilizada (BLANCO e GUIÁN, 1989). Contudo, a pH 10, não se observou efeitos sobre a atividade da enzima imobilizada. Comportamento similar foi observado nos estudos de imobilização realizados por Otero, Ballester e Guisán (1988), que não observaram efeito protetor do ácido butírico utilizado na imobilização a pH 10 de lipase de *Candida rugosa* em gel de glioxil-agarose. Ao contrário, Rodrigues (2005), que estudou a imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em quitosana, verificou um aumento no valor de atividade recuperada e na atividade hidrolítica do derivado imobilizado a pH 10 na presença de ácido butírico.

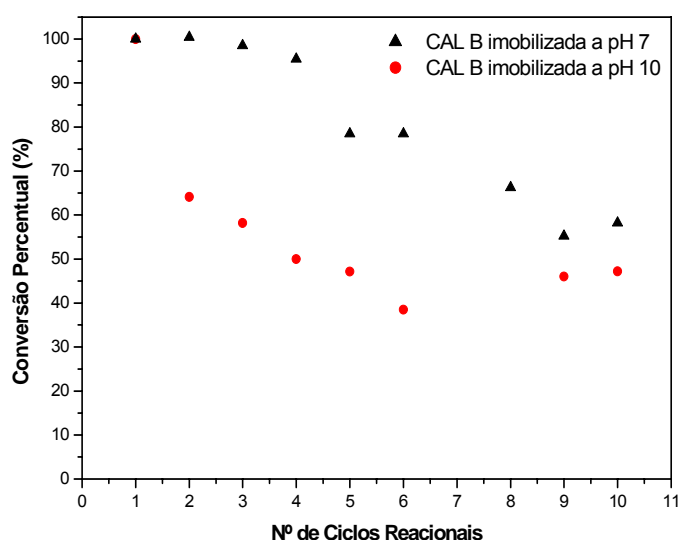
#### 4.3.3.3 Estabilidade do biocatalisador

A Figura 4.30 mostra os resultados do estudo de estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a pH 7 e pH 10. Pode-se observar que a enzima imobilizada a pH 10 é termicamente mais estável quando comparada à enzima imobilizada em pH 7. Esta maior estabilidade se deu, provavelmente, devido a um maior número de bases de Schiff formadas entre a enzima e o suporte no derivado obtido a pH 10.

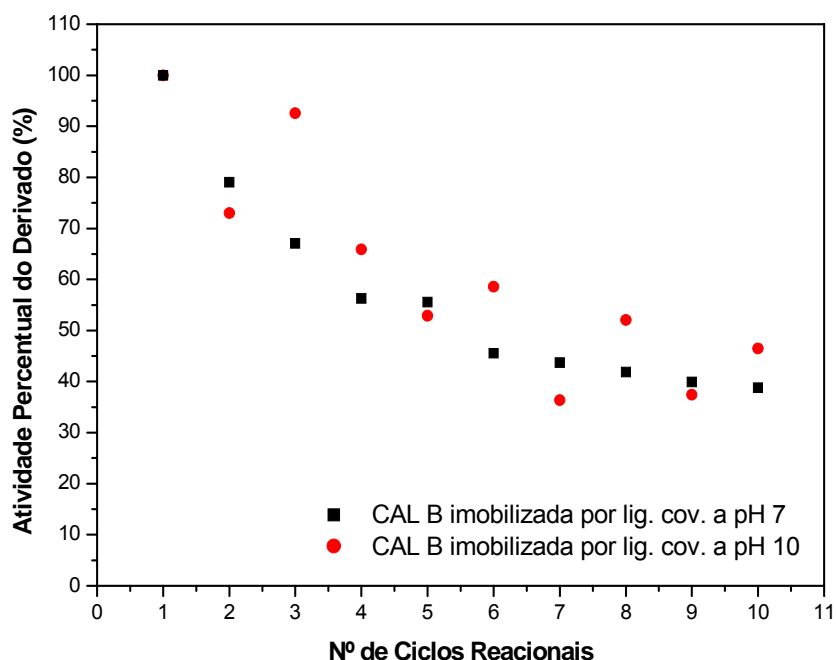


**Figura 4.30:** Estabilidade térmica a 60°C de lipase tipo B de *C. antarctica* imobilizada em fibra de coco por ligação covalente em diferentes valores de pH.

Ao avaliar a estabilidade operacional de síntese (Figura 4.31), observou-se que o derivado obtido a pH 7 foi bem mais estável quando comparado ao derivado obtido a pH 10. Contudo, o estudo da estabilidade operacional de hidrólise mostrou que ambos os derivados possuem perfis de decaimento semelhantes (Figura 4.32). Após 5 ciclos, as atividades residuais de CAL B imobilizada a pH 7 e pH 10 foram em torno de 55% para ambos em meio aquoso e, respectivamente, 75% e 45% em meio orgânico. E, após 10 ciclos reacionais, as atividades residuais ficaram em torno de 40% e 45% em meio aquoso e 55% e 45% em meio orgânico, para CAL B imobilizada a pH 7 e pH 10 respectivamente. Devido à formação de um maior número de bases de Schiff, durante a imobilização a pH 10, esperava-se uma maior estabilidade operacional deste derivado, fato que não foi observado experimentalmente. Acredita-se que dois fatores sejam responsáveis por este comportamento: i) as bases de Schiff formadas entre a enzima e o suporte não foram reduzidas e ii) o derivado apresenta baixa carga enzimática, devido à baixa disponibilidade de grupos disponíveis no suporte para ligação da molécula de enzima, a qual, em pH 10, encontra-se ligada ao suporte por mais de um grupo funcional. Assim, uma pequena perda de atividade nas enzimas imobilizadas, torna-se altamente representativa no rendimento da reação catalisada e, conseqüentemente, na conversão de ácido butírico.

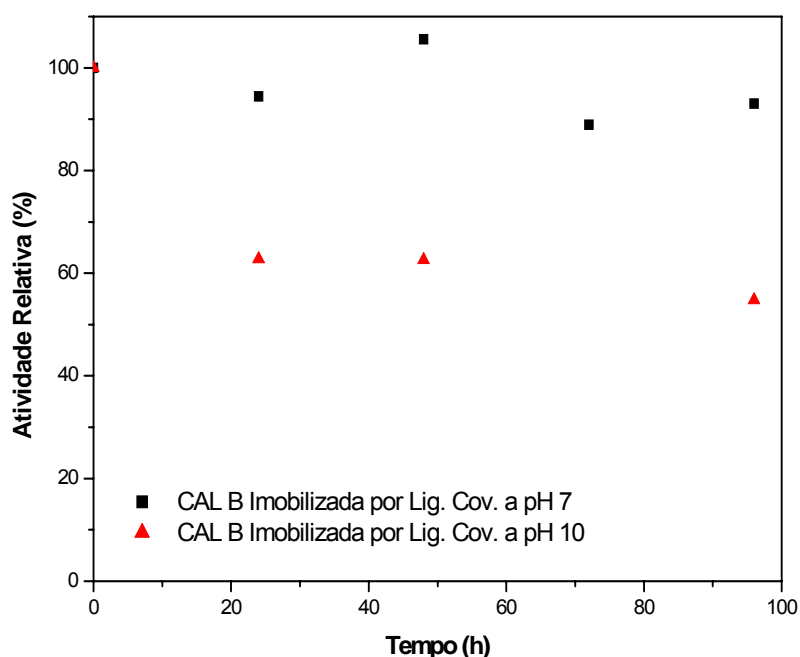


**Figura 4.31:** Estabilidade operacional de lipase tipo B de *C. antarctica* imobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 7 e pH 10, avaliada através de ciclos subsequentes de síntese de butirato de butila em meio orgânico a 30°C.



**Figura 4.32:** Estabilidade operacional de lipase do tipo B de *C. antarctica* immobilizada em fibra de coco por ligação covalente a pH 7 e pH 10, avaliada através de ciclos subsequentes de hidrólise de butirato de metila a temperatura ambiente.

A estabilidade à estocagem dos derivados obtidos a pH 7 e pH 10 também foi avaliada. A Figura 4.33 mostra os resultados do estudo de estabilidade à estocagem. Pode-se observar que o derivado obtido a pH 10 é mais instável do que o derivado obtido a pH 7. Essa instabilidade, observada no derivado immobilizado a pH 10, pode ser provocada pela continuidade da reação dos grupos aminas da lipase com os grupos aldeídos da fibra funcionalizada, mesmo na ausência de um meio aquoso, haja vista que nenhum agente foi utilizado para inativar os grupos aldeídos remanescentes na fibra após a immobilização. Tal observação mostrou a necessidade de estudar o uso de um agente capaz de inativar estes grupos remanescentes, sendo este estudo discutido no item 4.3.3.4 do presente capítulo.



**Figura 4.33:** Estabilidade à estocagem sob refrigeração de lipase tipo B de *C. antarctica* immobilizada em fibra de coco por ligação covalente em diferentes valores de pH.

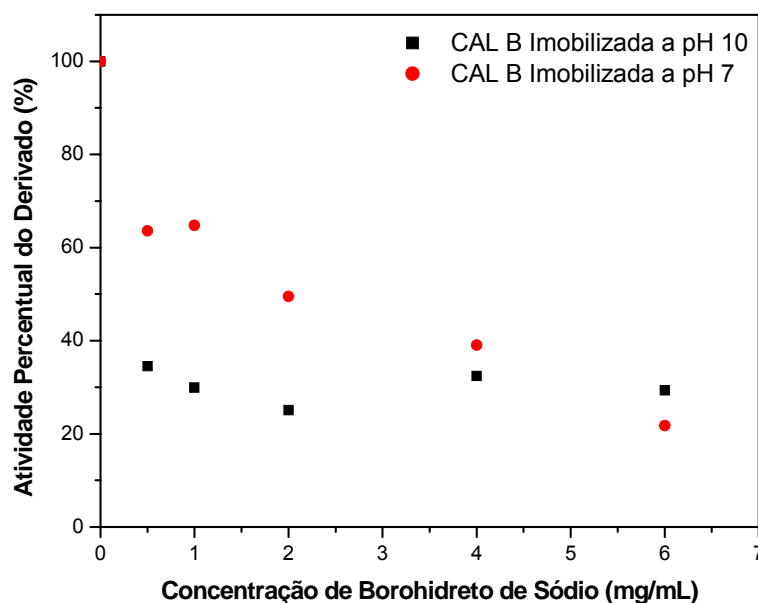
#### 4.3.3.4 Influência do uso de borohidreto de sódio para redução dos grupos remanescentes no suporte após imobilização

Devido à instabilidade à estocagem do derivado obtido por ligação covalente a pH 10 e sabendo-se da necessidade de inativar os grupos aldeídos remanescentes no suporte, bem como da instabilidade das bases de Schiff formadas entre a enzima e o suporte funcionalizado, avaliou-se a influência do uso de borohidreto de sódio – substância que, além de reduzir as bases de Schiff presentes, converte os grupos aldeídos excedentes em hidroxilas inertes (BLANCO, CALVETE e GUISÁN, 1989) – como agente redutor na etapa final do processo de imobilização por ligação covalente.

Inicialmente, o efeito de concentrações de borohidreto de sódio, entre 0,5 e 6 mg por mL de solução de enzima, na atividade do derivado foi estudado (Figura 4.34). O uso de baixas concentrações de borohidreto causou uma menor desnaturação das enzimas immobilizadas a pH 7. Quanto aos derivados obtidos a pH 10, acredita-se que a baixa carga enzimática presente antes e após o tratamento



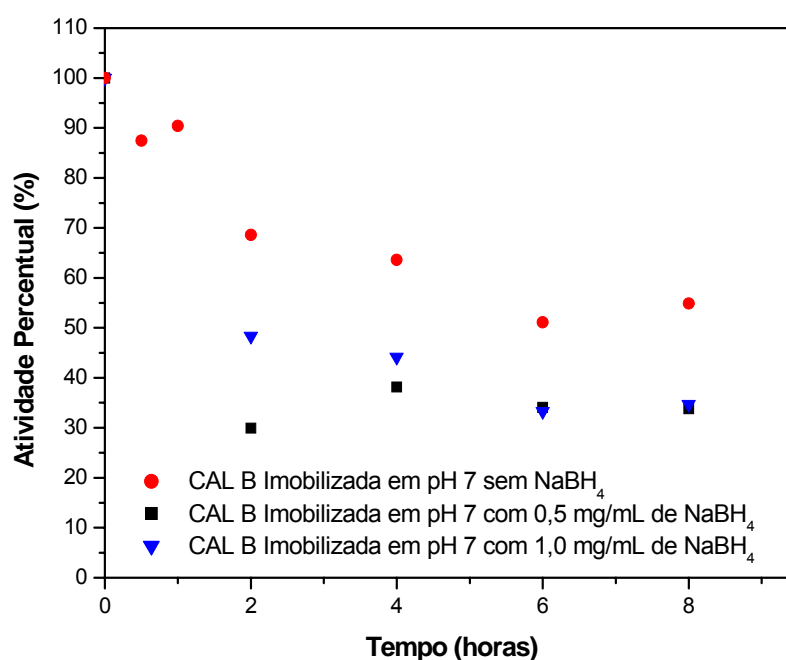
com borohidreto, 15,28 U/g, e, em média, 5 U/g, respectivamente, promova uma falsa ausência de influência frente à variação de concentração do agente redutor. Porém, é notório que, em ambos os casos, ocorre uma desnaturação parcial das enzimas imobilizadas, sendo maiores perdas observadas a pH 10.



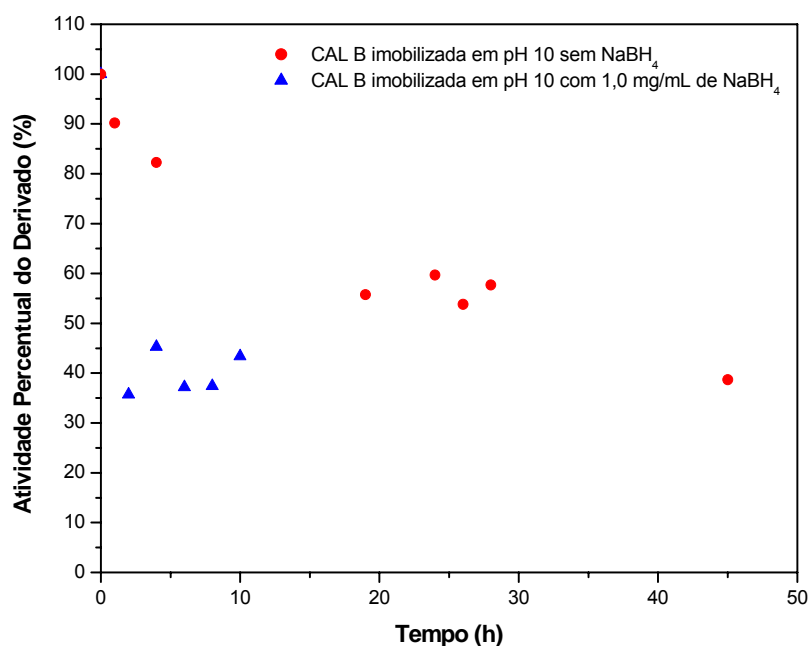
**Figura 4.34:** Influência da concentração de borohidreto de sódio na atividade do derivado obtido a partir da imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco, por ligação covalente.

Em função dos resultados obtidos, fez-se um estudo de estabilidade térmica do biocatalisador resultante da redução com 1 mg/mL de borohidreto de sódio. O uso de tal concentração tem sido reportado em vários trabalhos (BLANCO e GUIÁN, 1989; MATEO *et al.*, 2005; OTERO, BALLESTEROS e GUIÁN, 1988). No caso específico da imobilização a pH 7, a concentração 0,5 mg/mL também foi selecionada a fim de avaliar a existência de diferença de estabilidade entre os derivados. As Figuras 4.35 e 4.36 mostram os resultados obtidos para pH 7 e pH 10, respectivamente. Comparando a estabilidade térmica dos derivados obtidos antes e após o tratamento com borohidreto de sódio, observou-se que, tanto na imobilização a pH 10 quanto a pH 7, o tratamento, além de promover desnaturação parcial das enzimas imobilizadas, reduziu a estabilidade dos derivados obtidos. No caso

específico da imobilização a pH 7, não houve diferença significativa no perfil de estabilidade do derivado obtido após tratamento com 0,5 mg ou 1 mg de borohidreto por mL de solução de enzima. Na faixa de tempo estudada, não se observou variação significativa entre os perfis de estabilidade térmica dos derivados tratados com borohidreto obtidos a pH 7 e pH 10, enquanto que Blanco e Guisán (1989) obtiveram maior estabilidade térmica em derivados obtidos a pH 10. A diminuição do valor do tempo de meia vida aparente (Equação 3.18) do derivado obtido a pH 7, antes e após o tratamento com borohidreto, foi de 24,76% e 14,52% para as concentrações de 0,5 mg/mL e 1 mg/mL de borohidreto, respectivamente (Tabela 4.20). Para o derivado obtido a pH 10, a redução no tempo de meia vida aparente com o tratamento de borohidreto foi de 84,51%, bem superior ao observado na imobilização a pH 7 (Tabela 4.20).



**Figura 4.35:** Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco, por ligação covalente, a pH 7, com ou sem o uso de borohidreto de sódio após a imobilização.

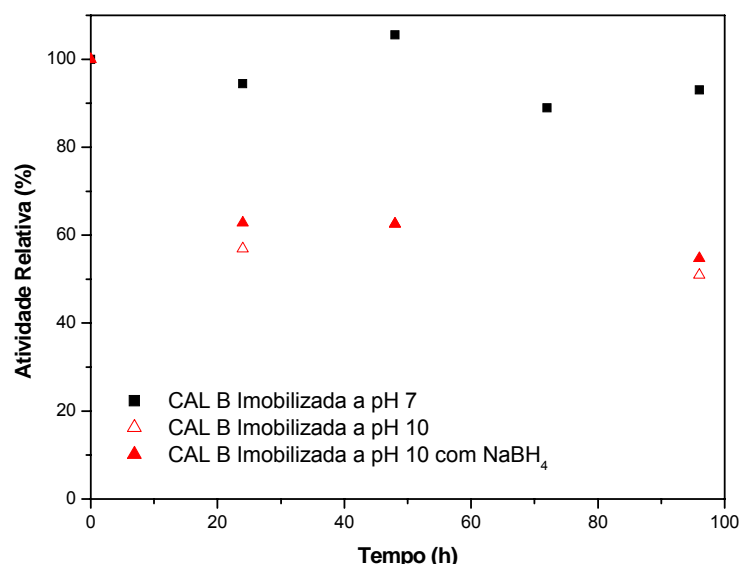


**Figura 4.36:** Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco, por ligação covalente, a pH 10, com ou sem o uso de borohidreto de sódio após a imobilização.

**Tabela 4.20:** Parâmetros do estudo de estabilidade térmica a 60°C da lipase imobilizada por ligação covalente em fibra de coco funcionalizada, a pH 7 e pH 10, antes e após o tratamento com borohidreto de sódio.

Enzimas	$k_1$ (h <sup>-1</sup> )	$k_2$ (h <sup>-1</sup> )	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$t_{1/2}$ (h)	F
Solução de lipase a 60°C	7,14	-	99,91	-	0,0968	1
Derivado obtido a pH 7, sem NaBH <sub>4</sub>	0,106	-	95,08	-	6,54	67,56
Derivado obtido a pH 7, com 1 mg/mL NaBH <sub>4</sub>	0,124	-	78,47	-	5,59	57,75
Derivado obtido a pH 7, com 0,5 mg/mL NaBH <sub>4</sub>	0,141	-	86,31	-	4,92	50,83
Derivado obtido a pH 10, sem NaBH <sub>4</sub>	0,020	-	92,27	-	34,66	358,06
Derivado obtido a pH 10, com 1 mg/mL NaBH <sub>4</sub>	0,129	-	89,69	-	5,37	55,47

Blanco e Guisán (1989) afirmam que o borohidreto de sódio pode provocar o rompimento de ligações disulfídicas ou a quebra das ligações peptídicas da enzima, promovendo a desnaturação da mesma. Desta feita, supõe-se que a perda de atividade e estabilidade observadas é causada pelo efeito destrutivo nas estruturas de proteínas que o borohidreto possui. Além disso, a adição de borohidreto de sódio não promoveu maior estabilidade à estocagem (Figura 4.37). Sob este cenário, faz-se necessário um estudo de alternativas de redução das bases de Schiff que não promovam desativação e diminuição da estabilidade de forma tão intensa, como as aqui observadas.



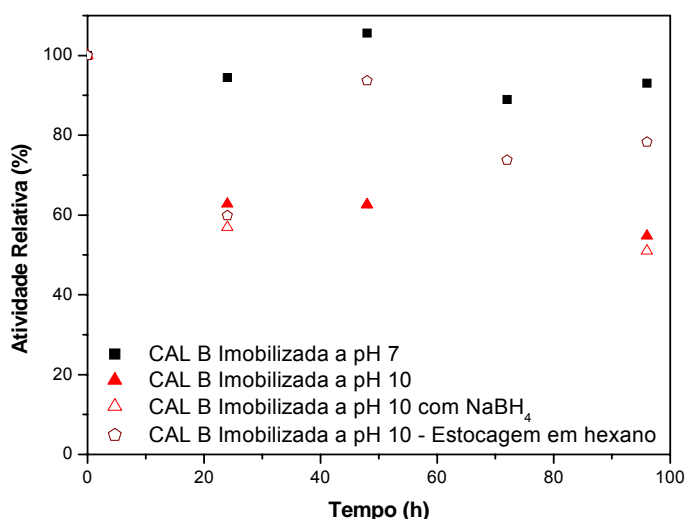
**Figura 4.37:** Estabilidade à estocagem sob refrigeração de lipase tipo B de *C. antarctica* imobilizada em fibra de coco verde por ligação covalente a diferentes valores de pH.

Um ponto a se considerar é que, apesar das bases de Schiff serem instáveis, esta característica é muito importante para a formação de ligações multipontuais intensas, mas não distorcidas. Devido à reversibilidade destas reações, é possível que alinhamentos termodinamicamente desfavoráveis sejam desfeitos promovendo um novo alinhamento e evitando ligações distorcidas, que acarretariam na perda de atividade. Assim, uma alternativa a ser avaliada na imobilização de lipase em fibra de coco funcionalizada seria o teste de materiais de baixo peso molecular como L-lisina, etanolamina e glicina, para eliminar os grupos aldeídos não reagidos (PARK *et al.*, 2003). Contudo, segundo Blanco e Guisán (1989), a não redução das bases de

Schiff implica na impossibilidade de bloquear os grupos aldeídos remanescentes no suporte devido à reversibilidade desta reação. Tal fato favorece o uso de substâncias como cianoborohidreto de sódio e amina borana que, como o borohidreto de sódio, tanto atuam na redução das bases de Schiff quanto no bloqueio dos grupos aldeídos remanescentes (FERREIRA *et al.*, 2003). Frente a estas observações, é visível que os estudos a serem realizados quanto ao bloqueio dos grupos aldeídos devem ser minuciosos, a fim explorar a melhor combinação para obtenção de um derivado de alto potencial catalítico e estabilidade elevada.

#### 4.3.3.5 Uso de hexano como meio dispersante para estocagem

Buscando dar mais estabilidade à estocagem ao derivado obtido a pH 10, uma alternativa estudada foi o uso de hexano como meio dispersante para sua estocagem. A Figura 4.38 mostra a estabilidade à estocagem de diferentes derivados immobilizados. Pode-se observar que o derivado estocado na presença de hexano apresentou a maior estabilidade, dentre os casos estudados para pH 10 neste trabalho. Aparentemente, a presença do hexano impediu que enzima immobilizada sofresse desativação, mantendo sua atividade. Em estudos futuros, sua influência sobre a estabilidade à estocagem de derivados preparado por imobilização em pH 7 também deve ser avaliada.



**Figura 4.38:** Estabilidade à estocagem sob refrigeração de lipase tipo B de *C. antarctica* imobilizada em fibra de coco verde por ligação covalente a diferentes valores de pH, medida a partir da hidrólise de butirato de metila a pH 7,0 e temperatura ambiente.

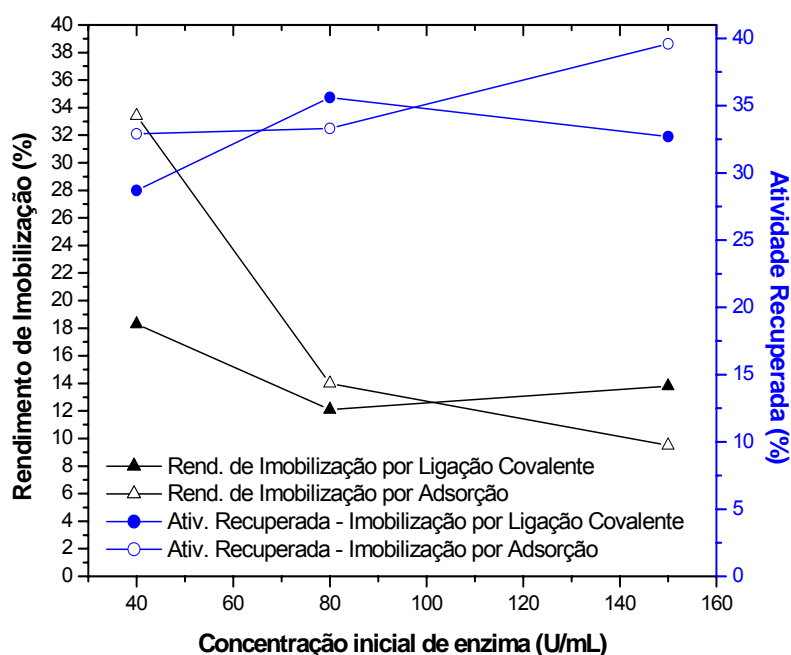
---

## 4.4 UM PARALELO ENTRE IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO E POR LIGAÇÃO COVALENTE

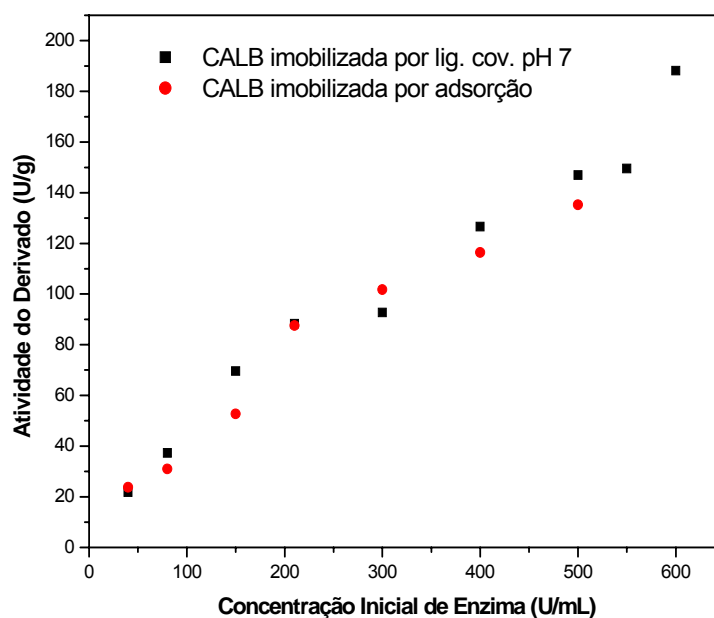
Enquanto a adsorção é um processo físico, envolvendo forças de ligação sem, contudo, constituir-se uma reação, a imobilização por ligação covalente é um processo químico, que se inicia por um processo físico, através do qual a enzima se aproxima do suporte, para possibilitar então a ocorrência de uma reação química entre enzima e suporte, formando uma ponte entre estes. Fazendo um paralelo entre imobilização por adsorção e imobilização por ligação covalente, pôde-se avaliar os derivados obtidos no estudo de imobilização de lipase em fibra de coco verde e identificar a melhor técnica para o sistema estudado.

### 4.4.1 Desempenho dos Processos de Imobilização

Uma forma de avaliar os processos de imobilização é observar alguns parâmetros de processo, tais como rendimento e atividade recuperada. A Figura 4.39 mostra uma comparação entre biocatalisadores preparados por adsorção e ligação covalente. Nota-se que para uma concentração inicial de enzima no sobrenadante igual a 80 U/mL, os valores de rendimento de imobilização e de atividade recuperada dos derivados são bem próximos. Comparando os resultados obtidos nos itens 4.2.3 e 4.3.2 do presente capítulo, observou-se que não há variação significativa entre os valores de atividade hidrolítica dos derivados obtidos tanto na imobilização por adsorção quanto na imobilização por ligação covalente (Figura 4.40).



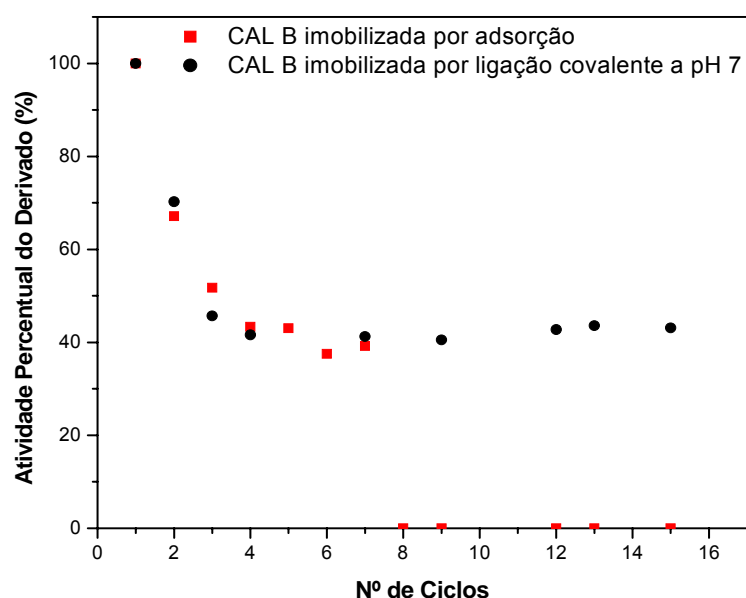
**Figura 4.39:** Influência da concentração inicial de enzima no rendimento de imobilização e na atividade recuperada dos biocatalisadores obtidos neste trabalho por adsorção e por ligação covalente, em pH 7,0 e a temperatura ambiente.



**Figura 4.40:** Influência da concentração inicial de enzima presente no sobrenadante na atividade enzimática nos derivados obtidos neste trabalho por adsorção e por ligação covalente, em pH 7,0 e a temperatura ambiente.

#### 4.4.2 Estabilidade dos Derivados Obtidos

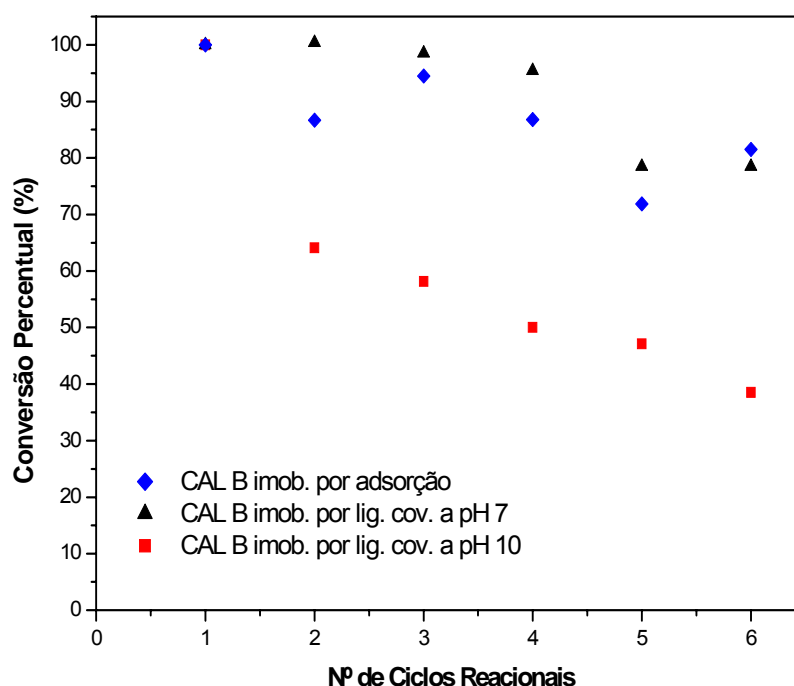
Sabe-se que enzimas imobilizadas por ligação covalente, devido à presença de uma ligação química, são mais estáveis do que as obtidas por adsorção simples (KENNEDY, WHITE e MELO, 1988). Isto foi comprovado quando se comparou o derivado obtido pelas diferentes técnicas de imobilização frente à estabilidade operacional de hidrólise de butirato de metila. Até o sétimo ciclo de hidrólise, os perfis de desativação dos derivados foram iguais, porém, enquanto o derivado obtido por ligação covalente a pH 7 permaneceu com a mesma atividade até o décimo quinto ciclo, último a ser avaliado, o derivado obtido por adsorção mostrou-se totalmente inativo a partir do oitavo ciclo (Figura 4.41). Enzimas imobilizadas por adsorção estão mais propensas a dessorção quando submetidas a reações em meio aquoso, o que pode ter ocasionado a perda de atividade observada no derivado obtido por adsorção. Também neste caso, de forma similar ao mencionado no item 4.2.6.1, a queda abrupta pode ser ocasionada pela baixa atividade do derivado após o sétimo ciclo, impedindo a sua determinação quando o derivado é submetido a um novo ciclo, sendo este valor considerado nulo.



**Figura 4.41:** Estabilidade operacional dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco, por adsorção e por ligação covalente a pH 7, medida através de ciclos consecutivos de reação de hidrólise de butirato de metila a pH 7,0 e temperatura ambiente.



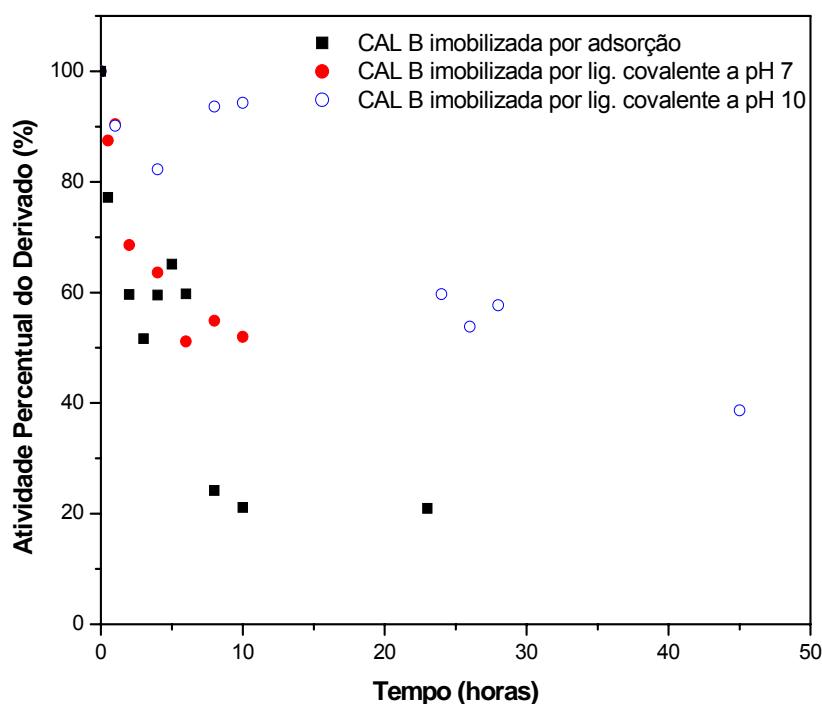
Cientes de que o comportamento de uma enzima difere dependendo do meio reacional e da reação catalisada, realizou-se o estudo da estabilidade operacional de síntese de butirato de metila em meio orgânico (Figura 4.42). A queda da conversão no decorrer dos ciclos realizados mostrou-se semelhante entre a lipase imobilizada por adsorção e a lipase imobilizada por ligação covalente em pH 7. Isto indica que o derivado preparado por adsorção é mais adequado para aplicações envolvendo meio orgânico do que meio aquoso.



**Figura 4.42:** Estabilidade operacional de síntese dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco, por adsorção e por ligação covalente, a pH 7 ou pH 10.

A Figura 4.43 mostra o estudo de estabilidade térmica à 60°C, realizado para três diferentes biocatalisadores. Puderam-se observar perfis semelhantes de desativação até o tempo de 6 horas, quando se comparou o derivado obtido por adsorção com o obtido por ligação covalente em pH 7. Após 6 horas, enquanto as enzimas ligadas covalentemente ao suporte permaneceram ativas, as enzimas adsorvidas sofreram maior desativação e/ou dessorção, estabilizando em um patamar mais baixo de atividade. Em paralelo, o derivado obtido por ligação covalente em pH 10, mostrou-se bastante estável, perdendo menos de 10% de sua

atividade durante as primeiras 10 horas avaliadas e perdendo 60% apenas após 45 horas de incubação. Este resultado é um indicador da existência de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte.



**Figura 4.43:** Estabilidade térmica a 60°C dos derivados obtidos a partir da imobilização de lipase de *C. antarctica* em fibra de coco, por adsorção e por ligação covalente a pH 7 e pH 10.

Fazendo um paralelo entre imobilização por adsorção e imobilização por ligação covalente, para reações em meio aquoso, a imobilização por ligação covalente é recomendável, haja vista que a lipase está propensa a se desorver do suporte. Contudo, em reações de síntese em meio orgânico, o derivado obtido por adsorção se mostrou tão estável quanto a lipase imobilizada por ligação covalente. Assim, considerando sua simplicidade e menor custo frente à ligação covalente, o uso da técnica de adsorção para imobilizar lipase em fibra de coco, visando a catalise de reações em meio orgânico, é a mais recomendável.

---

#### 4.5 BREVE ESTUDO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE DA FIBRA DE COCO VERDE

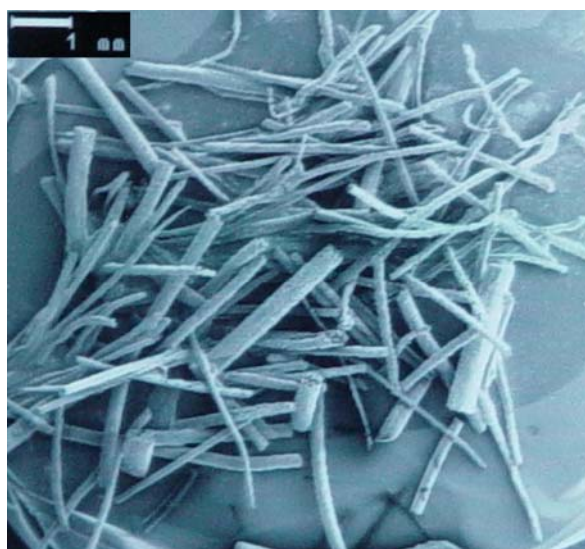
Os estudos de imobilização descritos anteriormente mostraram que a fibra de coco verde é um suporte de baixa área superficial e que a imobilização ocorre apenas na superfície externa da mesma. Em reações com macrosustratos, tais características são positivas, haja vista que o uso de suportes porosos poderia resultar em elevados tempos de reação provocados por impedimento estérico. Contudo, a formação de fissuras que tornassem acessível a parte interna da fibra à enzima tenderia a aumentar a área disponível para imobilização. Com uma maior área, problemas como baixa estabilidade operacional de hidrólise, adsorção em multicamadas e erro nos cálculos de rendimento e atividade recuperada para concentrações de enzima maiores que 150 U/mL seriam evitados e/ou amenizados.

A fibra de coco verde tem sido caracterizada quanto as suas características químicas e físicas sob um olhar uniforme, considerando apenas uma pequena variação provocada pelo fato de se trabalhar com um composto orgânico (BASAK, BHADURI e PAUL, 1983). Contudo, Aragão *et al.* (2002) mostraram que a composição dos componentes dos frutos de *Cocos nucifera* L. (casca e fibra, coque, albúmen sólido e albúmen líquido) mudam com a variedade da espécie e com a idade do fruto. Assim, estima-se que as características químicas e, conseqüentemente, físicas de cada fibra também possuam variações frente à idade do fruto e a variedade da espécie. A partir de uma revisão bibliográfica, buscou-se conhecer um pouco mais sobre o objeto de estudo em termos de composição, características mecânicas e estrutura. Tais conhecimentos foram essenciais para fundamentar o objetivo geral deste trabalho, que é o uso de fibra de coco verde, enquanto resíduo da agroindústria, como suporte para a imobilização de enzimas. Alguns estudos de aplicação de materiais celulósicos na obtenção de compósitos têm referenciado o uso de fibra de coco maduro, além de outras fibras tradicionais como juta e sisal (TOLEDO FILHO *et al.*, 2003; ROZMAN *et al.*, 2000; SAVASTANO JUNIOR, LUZ e NOLASCO, 1997). A partir de tais estudos, pôde-se ter uma idéia de como seria a morfologia do material com o qual se trabalhou. Todavia, cientes das possíveis diferenças provocadas pela origem e tempo de maturação, surgiu a necessidade de estudar a morfologia do material que de fato foi utilizado.

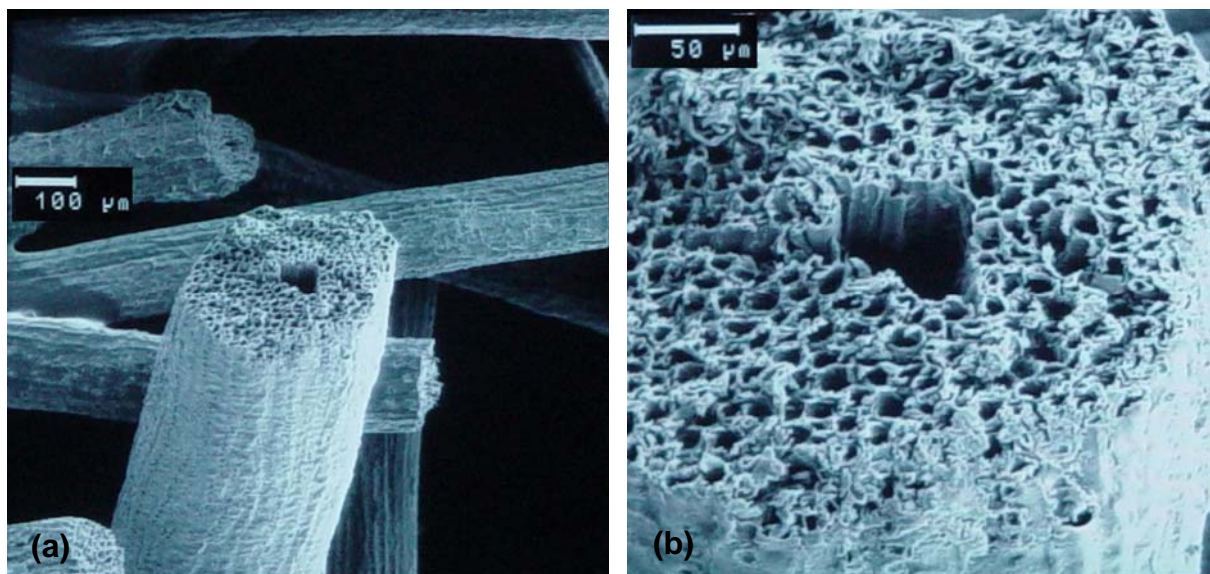
Frente a este cenário, buscou-se conhecer um pouco mais sobre o suporte utilizado, bem como explorar algumas formas de aumentar a área superficial deste. Logo, nesta seção, estão descritos os estudos das características morfológicas do suporte usado, os quais foram analisados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), bem como a influência de alguns tratamentos químicos na superfície da fibra e no processo de imobilização.

### 3.5.1 Fibra Natural: Aspectos e Variedades

Visualmente, é possível detectar uma variedade no material utilizado, no que diz respeito ao diâmetro da fibra. Um aumento de 10 x no material analisado (Figura 4.44) mostra de forma mais nítida esta observação. Esta característica também foi detectada por Silva *et al.* (2000), que encontraram uma faixa de 0,250 a 0,411 mm para o valor de diâmetro médio das fibras estudadas. Tal faixa é dita para o diâmetro médio devido à outra característica da fibra de coco, sessão transversal de formato oval, ver Figura 4.45(a) e Figura 4.45(b), de forma que os valores acima citados são resultados da média entre o menor e o maior diâmetro de uma dada fibra. Além do diâmetro, a superfície, como um todo, é bastante heterogênea, podendo-se observar porções bastante lisas e outras bem rugosas numa mesma amostra. Este resultado é melhor observado fazendo uma comparação entre as imagens obtidas e expostas no Apêndice E. Além disso, analisando o pH da superfície, o mesmo se encontra em 4,5.

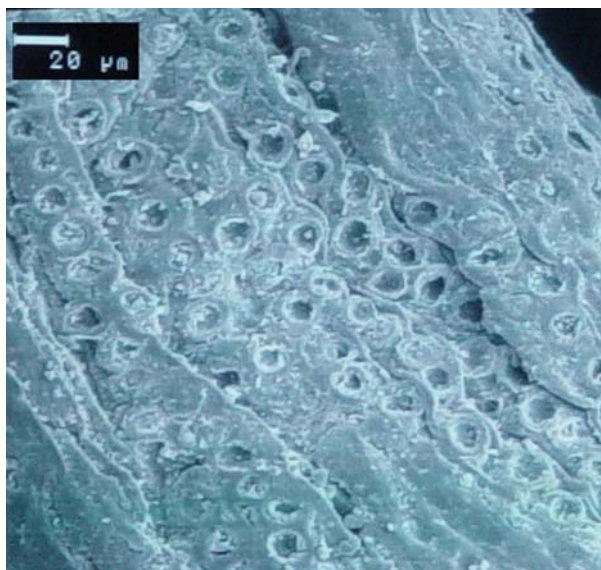


**Figura 4.44:** Imagem da amostra selecionada para observação através do MEV, obtida com aumento de 10 x, mostrando a sua heterogeneidade em relação ao diâmetro das fibras.

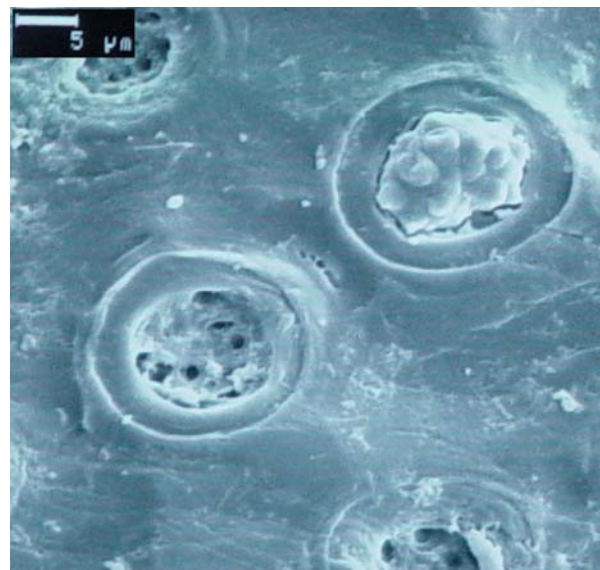


**Figura 4.45:** Imagem da sessão transversal de uma fibra de coco verde funcionalizada com GPTMS (a) obtida com aumento de 100 x e (b) obtida com aumento de 350 x, focando a sessão transversal da fibra.

A análise microscópica de uma amostra de fibra natural, isenta de qualquer tratamento e/ou lavagem, mostrou a presença de partículas sólidas aderidas à fibra (Figura 4.46). Tais partículas são, principalmente, frações de pó de coco e cristais salinos, detectadas anteriormente através da lavagem e de análise de condutividade elétrica da água de lavagem (ver item 4.2.1 do presente capítulo). Ainda referente à Figura 4.46, observou-se a presença de crateras, sendo algumas mais profundas e outras bem superficiais, dando a impressão de estarem recobertas por alguma substância. Uma busca na literatura reportou ao estudo de Silva *et al.* (2000), os quais realizaram uma caracterização mecânica e térmica de fibras obtidas de casca de coco verde coletadas em pontos de venda de água de coco. Os autores citam a existência de uma camada de cera, ácidos graxos e seus produtos de condensação sobre a superfície da fibra. Tal camada encobre orifícios presentes na superfície, tornando-a mais lisa quanto mais espessa for a camada, além de formar protuberâncias sobre a fibra (Figura 4.47).



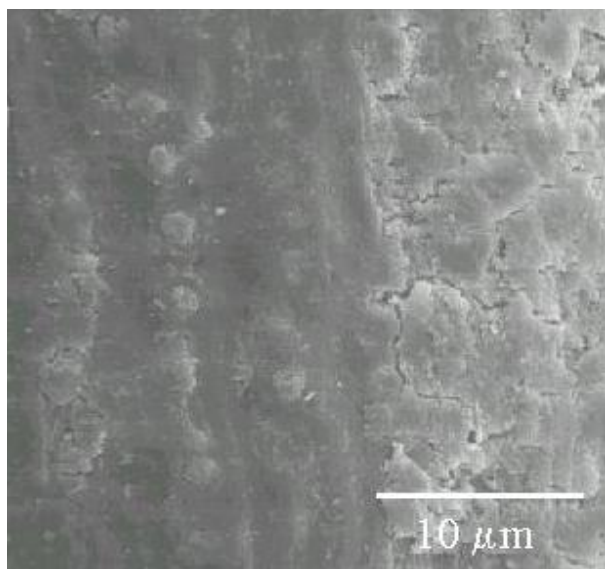
**Figura 4.46:** Imagem de uma fibra natural, obtida com aumento de 450 x, mostrando a presença de partículas sólidas.



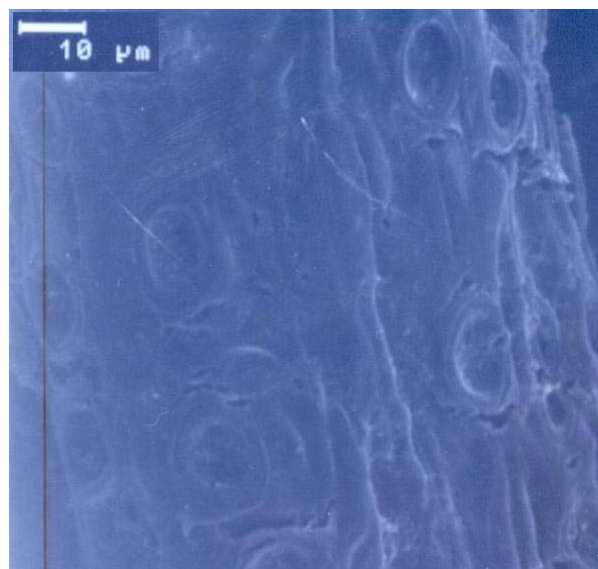
**Figura 4.47:** Detalhe de protuberância formada por ácidos graxos e ceras em contraste a um orifício natural da fibra sem a presença destes, aumento de 2.000 x.

Após uma intensa lavagem com água, observou-se o desaparecimento dos resíduos sólidos anteriormente presentes na superfície da fibra (Figura 4.48), proporcionando um leve aumento no valor do pH para 5,0. Mas a lavagem com água não foi suficiente para retirar a camada de cera e ácidos graxos contida na fibra. Contudo, quando se comparou as fibras lavadas com água com as fibras que sofreram uma lavagem com dodecil sulfato de sódio (SDS), ver item 3.2.4.1 de Materiais e Métodos e item 4.2.1 do presente capítulo, observou-se uma superfície mais limpa (Figura 4.49), isenta das protuberâncias formadas pela presença dos ácidos, o que mostra que tal tratamento foi eficiente na remoção dos mesmos. Porém, segundo Bismarck *et al.* (2001), 80%, em massa, dessas substâncias são ácidos saturados de longa cadeia de hidrocarbonetos – que não podem ser saponificados – e os demais componentes são ésteres – que podem ser saponificados, o que faz necessário o uso de outros tratamentos, seguidos ao SDS para completa “limpeza” da superfície da fibra. Apesar dos estudos mostrados no item 4.2.1, quando não se observou diferença entre a fibra lavada com água e a lavada com SDS no processo de imobilização, e considerando que lipases tendem a catalisar reações cujo substrato ou produto podem ser ácidos graxos, faz-se necessária a retirada destes da fibra, para evitar contaminação do meio reacional ou

influências no equilíbrio do sistema. Para tanto, é fundamental avaliar qual tipo de lavagem e tratamento químico devem ser realizados na fibra de coco verde para extração dessas impurezas, bem como avaliar a influência destes tratamentos no processo de imobilização.



**Figura 4.48:** Imagem da superfície de uma fibra de coco verde lavada com água, obtida com aumento de 500 x.



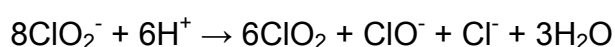
**Figura 4.49:** Imagem da superfície de uma fibra de coco verde lavada com SDS, obtida com aumento de 1000 x.

#### 4.5.2 Remoção de Impurezas: Algumas Tentativas de Tratamentos Químicos

Frente à necessidade de realizar um tratamento eficiente quanto à remoção das impurezas presentes na superfície da fibra, avaliou-se o uso de substâncias como clorito de sódio e hidróxido de sódio no tratamento químico da superfície da fibra de coco verde, bem como a influência destes tratamentos no processo de imobilização.

##### 4.5.2.1 Fibra tratada com clorito de sódio em meio ácido

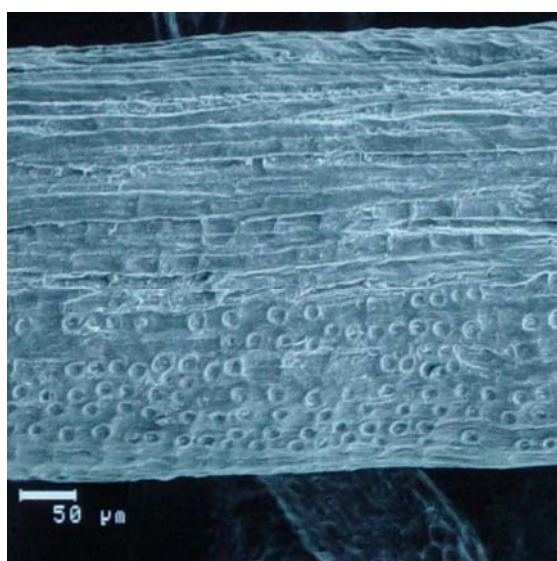
O clorito de sódio, em meio ácido, sofre reação redox produzindo  $\text{ClO}_2$  e  $\text{ClO}^-$ :



os quais reagem com a lignina presente na fibra promovendo a deslignificação da mesma. Tal reação é exclusivamente oxidativa, levando à formação de derivados do ácido mucônico e quinona, e tem sido bastante reportada em estudos que visam à

modificação da superfície de materiais lignocelulósicos (REYES, PERALTA-ZAMORA e DURAN, 1998).

Fazendo uma varredura na amostra selecionada, verificou-se um tratamento não uniforme, e morfologias distintas foram obtidas, dependendo do ponto da amostra analisado (Figura 4.50). O que mostra que em algumas superfícies o ataque foi mais intenso do que em outras. Reyes, Peralta-Zamora e Duran (1998), em seus estudos com a casca de arroz (Figura 4.51), obtiveram maior redução da lignina inicialmente presente (perda de 45% no teor de lignina) ao tratá-la com clorito de sódio, obtendo um material uniformemente modificado, apesar de que, visualmente, o tratamento se deu de forma branda. A não uniformidade obtida neste estudo deve-se, provavelmente, a distribuição heterogênea das impurezas, mostrando que um leve aumento na concentração de clorito de sódio ou no tempo de exposição devem ser avaliados para obtenção de uma fibra mais uniforme e totalmente isenta de impurezas.



**Figura 4.50:** Imagem da superfície de uma fibra de coco verde tratada com clorito de sódio obtida com aumento de 200 x.



**Figura 4.51:** Micrografia da epiderme externa da casca de arroz após pré-tratamento com clorito de sódio (REYES, PERALTA-ZAMORA e DURAN, 1998).

Uma análise do processo de imobilização mostrou valores bastante próximos de atividade hidrolítica no derivado, rendimento de imobilização e atividade recuperada (Tabela 4.21). Estes resultados indicam que a queda no valor do pH da superfície da fibra (pH = 3,0) provocada por este tratamento não influenciou significativamente no processo de imobilização.

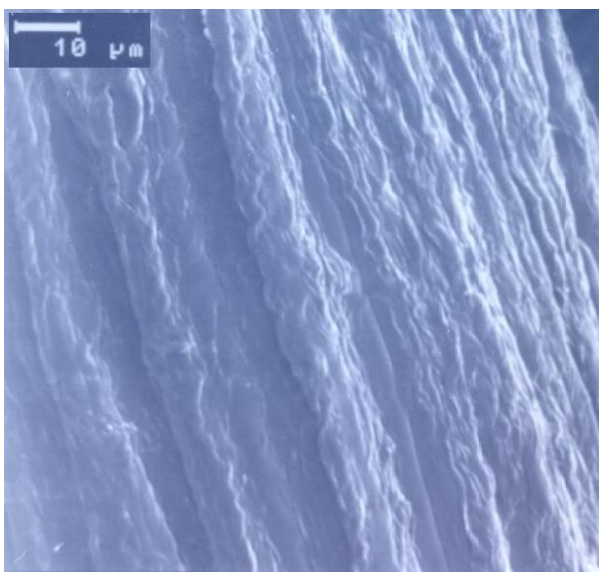


**Tabela 4.21:** Parâmetros do processo de imobilização a pH 7 em fibra de coco submetida a tratamento químico com clorito de sódio em meio ácido.

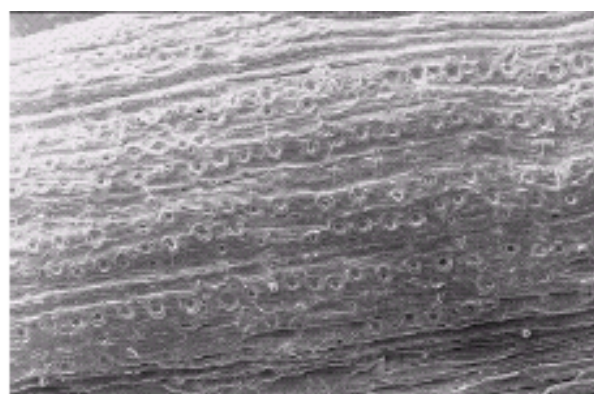
Parâmetros	Fibra natural	Fibra tratada
Atividade no derivado (U/g)	30,56 ± 2,0	34,22 ± 1,6
Rend. de imobilização (%)	12,94	19,48
Atividade recuperada (%)	58,98	48,33

#### 4.5.2.2 Fibra tratada com clorito de sódio e hidróxido de sódio

Considerando que hidróxido de sódio é bastante utilizado no tratamento de superfícies lignocelulósicas (MARTINS, KIYOHARA e JOEKES, 2004), fez-se uso deste, posteriormente ao tratamento com clorito de sódio, o qual foi realizado de forma mais branda. As fibras tratadas por este método, diferentemente do obtido no tratamento com clorito de sódio em meio ácido, apresentaram uma morfologia bastante uniforme, mostrando um ataque mais eficiente (Figura 4.52). Além disso, fazendo um paralelo com o tratamento realizado por Silva *et al.* (2000), que submeteram a fibra de coco a uma solução 5% de NaOH por 72 horas, constatou-se que os resultados obtidos pelos autores são semelhantes aos encontrados para o tratamento com clorito de sódio, apresentando uma morfologia mais heterogênea (Figura 4.53). Tais resultados mostraram que o tratamento misto foi mais eficiente na remoção de impurezas, modificando a superfície da fibra.



**Figura 4.52:** Superfície de uma fibra de coco verde tratada com clorito de sódio e 10% de NaOH, obtida com aumento de 1000 x.



**Figura 4.53:** Imagem de uma fibra de coco submetida a uma solução 5% de NaOH por 72h (SILVA *et al.*, 2000).

**Tabela 4.22:** Parâmetros do processo de imobilização por adsorção a pH 7 em fibra de coco submetida a tratamento químico com clorito de sódio e 10% de NaOH.

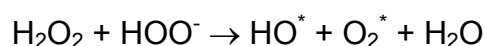
Parâmetros	Fibra natural	Fibra tratada
Atividade no derivado (U/g)	30,56 ± 2,0	9,94 ± 1,3
Rend. de imobilização (%)	12,94	-
Atividade recuperada (%)	58,98	-

Fazendo uma comparação entre a imobilização de CAL B em fibra de coco lavada com água e em fibra tratada com clorito de sódio e NaOH, observou-se menor atividade hidrolítica no derivado obtido a partir de fibra tratada (Tabela 4.22). Valores de rendimento de imobilização e atividade recuperada não puderam ser calculados, já que a atividade do sobrenadante foi igual a atividade da solução inicialmente oferecida para a imobilização. Isto indica que houve baixa adsorção de lipase, provavelmente devido à mudança de pH da fibra com o tratamento. Estudos realizados anteriormente, ver item 4.2.4, mostraram que a atividade do derivado diminuiu quando se imobilizou em fibra com pH 7. Como a fibra tratada com clorito de sódio e NaOH apresenta um valor de pH da superfície igual a 9,0, acredita-se que tal valor tão básico tenha influenciado no processo de imobilização. Para confirmar tal hipótese, um teste de imobilização após ajustar o pH da superfície da fibra tratada para 5 (valor da fibra lavada) deve ser realizado.

#### 4.5.2.3 Fibra tratada com peróxido de hidrogênio

Shukla e Pai (2005) reportaram melhores resultados de adsorção de metais pesados em fibra de juta cuja superfície fora tratada por oxidação com peróxido de hidrogênio. Desta forma, buscando otimizar o processo de adsorção, realizou-se o tratamento superficial da fibra de coco verde com peróxido de hidrogênio e avaliou-se a sua influência no processo de imobilização.

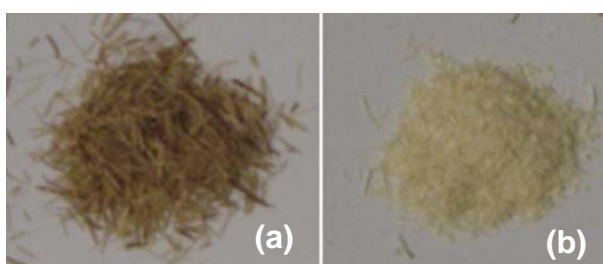
O peróxido de hidrogênio, quando em meio básico, forma o ânion hidroperóxido que reage com uma molécula não ionizada de peróxido formando um radical hidroxila altamente reativo:



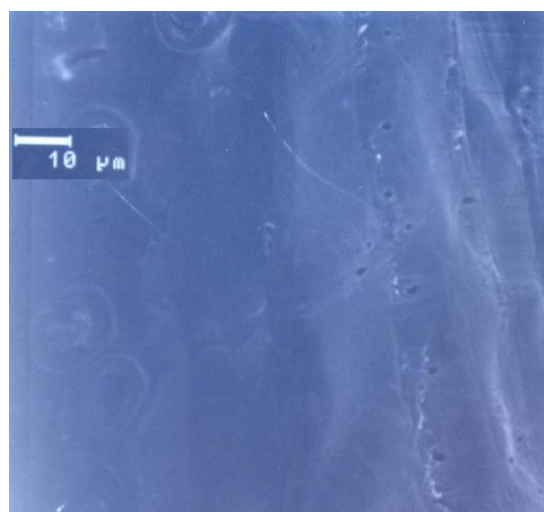
Este oxida os grupos hidroxilas da celulose presente na fibra a grupos carboxilas, promovendo à fibra um suave potencial catiônico de troca iônica (REYES, PERALTA-ZAMORA e DURAN, 1998; SHUKLA e PAI, 2005).

A fibra obtida por oxidação apresenta uma cor amarela clara, aspecto visual bem distinto das demais, que variam entre tonalidades de marrom (Figura 4.54). Sabendo-se que a oxidação do peróxido de hidrogênio é bastante utilizada no processo de branqueamento de fibras (REYES, PERALTA-ZAMORA e DURAN, 1998), supõe-se que os pigmentos existentes na fibra de coco foram extraídos após a oxidação, promovendo esta mudança na coloração. Contudo, o MEV desta fibra mostrou que não houve modificações morfológicas em relação à fibra lavada com água, persistindo, inclusive a presença de ácidos graxos e ceras sobre a sua superfície (Figura 4.55).

Quando se comparou o processo de imobilização de CAL B em fibra oxidada com a imobilização em fibra lavada apenas com água, observaram-se valores de atividade hidrolítica do derivado, rendimento de imobilização e atividade recuperada muito semelhantes para os dois derivados (Tabela 4.23). Considerando que a superfície obtida após tratamento possui valor de pH igual a 4,5, valor este bem próximo ao da fibra lavada com água (pH = 5), é provável que esta semelhança tenha favorecido a similaridade dos parâmetros do processo de imobilização.



**Figura 4.54:** Fibra de coco verde (a) lavada com água e (b) oxidada com peróxido de hidrogênio.



**Figura 4.55:** Microfotografia de uma fibra de coco submetida a oxidação com peróxido de hidrogênio, obtida com aumento de 1000 x.

**Tabela 4.23:** Parâmetros do processo de imobilização a pH 7 em fibra de coco submetida à oxidação com peróxido de hidrogênio.

<b>Parâmetros</b>	<b>Fibra natural</b>	<b>Fibra oxidada</b>
Atividade no derivado (U/g)	30,56	24,83 ± 5,3
Rend. de imobilização (%)	12,94	13,15
Atividade recuperada (%)	58,98	51,94

---

## 5 CONCLUSÕES

Os estudos de imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* em fibra de coco verde mostraram a obtenção de derivados estáveis tanto por adsorção quanto por ligação covalente, o que comprova o potencial da fibra de coco verde como suporte de imobilização.

Para o processo de imobilização por adsorção, variáveis como concentração inicial de enzima, tempo de imobilização e pH do meio de imobilização foram estudadas. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

- O pré-tratamento da fibra para remoção de impurezas como partículas sólidas, sais e ácidos graxos faz-se necessário para evitar contaminação do meio reacional ou influências no equilíbrio do sistema;
- Quanto maior a concentração inicial de enzima no processo de imobilização de CAL B em fibra de coco por adsorção, maior a atividade hidrolítica do derivado obtido, para concentrações iniciais de enzima até 500 U/mL. Esse comportamento crescente de atividade hidrolítica no derivado resulta, provavelmente, da formação de multicamadas a altas concentrações, comprovado pelo estudo de estabilidade térmica de um derivado obtido a partir de solução inicial de enzima com 280 U/mL;
- O tempo de 2 horas de contato no aparato rotatório é suficiente para que o sistema fibra-lipase atinja o equilíbrio, considerando concentrações iniciais de lipase de até 150 U/mL;
- A fibra de coco possui um caráter iônico, observado pelos dois patamares de imobilização obtidos frente à variação do pH do meio, o que caracteriza a presença de forças eletrostáticas atuando na imobilização de lipase;
- Dentre os valores de pH de imobilização estudados, a imobilização a pH 7 foi a que proporcionou maior estabilidade térmica ao derivado;
- O pH ácido da superfície da fibra de coco não interfere na migração dos grupos acilas e, consecutivamente, não influencia na reação de esterificação;
- O processo de imobilização por adsorção, nas condições estudadas, não influenciou na interação enzima-substrato resultando em valores iguais das

---

constantes da equação de Michaelis-Menten ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ), em comparação com dados cinéticos para a enzima livre;

- Apesar da baixa estabilidade operacional de hidrólise, a adsorção promove à CAL B estabilidade operacional de síntese similar a obtida por imobilização covalente e considerável estabilidade térmica, gerando fatores de estabilidade de 2,07 e 92,15 para as temperaturas de 50°C e 60°C, respectivamente;

Dentre as variáveis estudadas para o processo de imobilização por ligação covalente, pode-se citar carga máxima do suporte, tempo de imobilização e pH de imobilização. Uma análise dos resultados obtidos mostrou que:

- O uso do pré-tratamento do suporte com hexano no processo de imobilização de CAL B em fibra de coco funcionalizada não é uma prática eficiente frente às características do sistema usado devido, principalmente, a característica da CAL B de não sofrer ativação interfacial;
- A variação da concentração inicial de enzima possui efeito positivo significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a atividade hidrolítica dos derivados obtidos a pH 7;
- Como no processo de adsorção, não se observou um patamar de saturação na imobilização por ligação covalente a pH 7, para concentrações iniciais de enzima até 600 U/mL. Tal patamar talvez não seja visível devido à formação de multicamadas a altas concentrações, confirmado pelo estudo de estabilidade térmica de um derivado obtido a partir de solução inicial de enzima com 280 U/mL;
- Para a imobilização por ligação covalente a pH 7, o tempo de contato de 2 horas foi suficiente para que a enzima forme bases de Schiff, ligando-se covalentemente ao suporte;
- A utilização de PEG 6.000 e ácido butírico durante o processo de imobilização por ligação covalente a pH 7 e pH 10 não possui efeitos significativos tanto sobre a atividade hidrolítica do derivado obtido quanto sobre a conversão de ácido butírico da reação de síntese;
- Imobilização a pH 10 promoveu a obtenção de derivado termicamente mais estável do que o obtido a pH 7, o que é um indício de que a lipase tenha se ligado de forma multipontual a fibra funcionalizada;

- 
- O uso do borohidreto de sódio, como agente redutor para o sistema estudado, mostrou-se insatisfatório haja vista que o mesmo reduz a estabilidade térmica do derivado obtido, tanto a pH 7 quanto a pH 10. Desta forma, faz-se necessário o estudo de outros agentes para a redução das bases de Schiff formadas entre a enzima e o suporte e inativação dos grupos aldeídos não reagidos;
  - O uso de hexano como meio dispersante promove maior estabilidade à estocagem em derivados obtidos por imobilização a pH 10;
  - Embora a técnica de imobilização em pH 10 promova grande estabilidade térmica, devido a baixa carga imobilizada, baixa estabilidade operacional de síntese e a baixa estabilidade à estocagem, a mesma não é adequada para a imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* em fibra de coco verde funcionalizada.

Por fim, comparando a lipase imobilizada em fibra de coco por adsorção com a lipase imobilizada por ligação covalente, pode-se concluir que, derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco por adsorção são, potencialmente, bons catalisadores para reações em meio orgânico. Para reações de hidrólise, indica-se o uso de derivados obtidos a partir da imobilização de lipase tipo B de *C. antarctica* em fibra de coco por ligação covalente a pH 7.

---

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Através do estudo de imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra da casca de coco verde como suporte foi possível confirmar o potencial deste suporte. Contudo, há alguns pontos que ainda podem ser explorados, como:

- Estudar outros tratamentos na superfície da fibra objetivando a obtenção de uma maior área superficial;
- Investigar o potencial de fibra oxidada com periodato de sódio para a imobilização por ligação covalente;
- Testar estabilidade térmica de derivados obtidos por adsorção em pH 6, 7,5 e 8 a fim de avaliar a influência do pH do meio de imobilização na estabilidade do derivado obtido;
- Avaliar a influência de baixa força iônica no meio reacional na estabilidade operacional de hidrólise de enzimas imobilizadas por adsorção;
- Avaliar o efeito de maior tempo de contato e maiores cargas enzimáticas oferecidas para imobilização por ligação covalente em pH 7 e 10 na estabilidade térmica do derivado obtido;
- Avaliar a influência da presença de ácido butírico no processo de imobilização fazendo uso de reagentes redutores de bases de Schiff bem como nos estudos de tempo de contato a pH 10;
- Testar materiais de baixo peso molecular como L-lisina e glicina para eliminar os grupos aldeídos não reagidos durante a imobilização por ligação covalente;



- Testar o uso de agentes bifuncionais (cianoborohidreto de sódio, amina borana etc) para eliminar os grupos aldeídos não reagidos e reduzir as bases de Schiff formadas durante a imobilização por ligação covalente;
- Verificar o potencial de reuso de sobrenadantes obtidos de estudos de imobilização;

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMOULEH, M.; BOUFI, S.; BELGACEM, M. N.; DUARTE, A. P.; BEN SALAH, A.; GANDINI, A. Modification of cellulosic fibres with functionalised silanes: development of surface properties. **International Journal of Adhesion & Adhesives**, v. 24, p. 43-54, 2004.
- ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W. Synthesis of ascorbyloleate by immobilized *Candida antarctica* lipases. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3177-3180, 2005.
- ADRIANO, W. S. **Estudos da imobilização de penicilina G acilase em quitosana: desenvolvimento de um novo biocatalisador para a produção de antibióticos  $\beta$  - lactâmicos**. Fortaleza, 2004. 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará.
- AGOPYAN, V.; SAVASTANO JUNIOR, H.; JOHN, V. M.; CINCOTTO, M. A. Developments on vegetable fibre-cement based materials in São Paulo, Brazil: an overview. **Cement & Concrete Composites**, v. 27, p. 527-536, 2005.
- AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilization: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 207-215, 2000.
- ARAGÃO, W. M.; RESENDE, J. M.; CRUZ, E. M. O.; REIS, C. S. SAGGIN JUNIOR, O. J.; ALENCAR, J. A.; MAREIRA, W. A.; PAULA, F. R.; LIMA FILHO, J. M. P. Fruto do coqueiro para consumo natural. In: ARAGÃO, W. M. (Org.). **Coco. Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 76p.
- ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J.M.S.; SINISTERRA, J.V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 3-12, 1999.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1986. 984p.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 2002. 401p.
- BASAK, M. K.; BHADURI, S. K.; PAUL, N. B. Nature of the microbiologically extracted coir fiber from green coconut husks – An agro-waste. **Agricultural Wastes**, v. 5, p. 51-58, 1983.

- BASTIDA, A.; SABUQUILLO P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 486-493, 1998.
- BISMARCK, A.; MOHANTY, A. K.; ARANBERRI-ASKARGORTA, I.; CZAPLA, S.; MISRA, M.; HINRICHSEN, G.; SPRINGER, J. Surface characterization of natural fibers; surface properties and the water up-take behavior of modified sisal and coir fibers. **Green Chemistry**, v. 3, p. 100-107, 2001.
- BLANCO, R. M.; CALVETE, J. J.; GUISÁN, J. M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 353-359, 1989.
- BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 360-366, 1989.
- BLANCO, R.M.; TERREROS, P.; PÉREZ, M. F.; OTERO, C.; GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 83-93, 2004.
- BON, E. P. S.; PEREIRA JUNIOR, N. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: Bon & Pereira Junior, 1999. 110p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAHMAKUMAR, M.; PAVITHRAN, C.; PILLAI, R. M. Coconut fiber reinforced polyethylene composites: effect of natural waxy surface layer of the fibre on fibre/matrix interfacial bonding and strength of composites. **Composites Science and Technology**, v.65, p.563-569, 2005.
- BRÍGIDA, A. I. S.; PINTO, G. A. S.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo do potencial da fibra do coco verde como suporte para imobilização de lipase. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 15, 2005, Recife. **Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Recife: 2005, 7p.
- BRÍGIDA, A. I. S.; ROSA, M. F. Determinação do teor de taninos na casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.). **Proceedings of The Interamerican Society For Tropical Horticulture**, v.47, p. 25-27, 2003.
- BRILHANTE, O. M.; CALDAS, L. Q. A (coord.). **Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 155 p., 1999.

- BRUNO, L. M.; PINTO, G. A. S.; CASTRO, H. F.; LIMA-FILHO, J. L.; MELO, E. H. M. Variables that affect immobilization of *Mucor miehei* lipase on nylon membrane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 371-375, 2004.
- CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 1-10, 2005.
- CAO, L.; VAN LANGEN, L.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 387-394, 2003.
- CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca de coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.20, p.533-535, 2002.
- CASTRO, H. F.; LIMA, R.; ROBERTO, I. C. Rice straw as a support for immobilization of microbial lipase. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 1061-1064, 2001.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleo e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; PEREIRA, E. B. Influence of substrate partition coefficient on the performance of lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate by alcoholysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, p.859-866, 2000.
- CASTRO, H. F.; SILVA, M. L. C. P.; SILVA, G. L. J. P. Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 849-857, 2000.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, p. 237-241, 1997.
- CHEN, J.-P. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 404-407, 1996.
- CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; DELORME, P.; WILLEMOT, R. M. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 276, p. 181-184, 1990.
- CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução a bioquímica**. 4 ed. Tradução de J. R. Magalhães; L. Mennucci. São Paulo: Edgard Blücher, 1980. 525p.
- CORDÃO TERCEIRO NETO, C. P.; FERREIRA, F. F. H.; BEZERRA, F. C.; SOUSA, R. F.; CAVALCANTI, M. L. F. Efeito de diferentes substratos na aclimatização "ex-vitro" de mudas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionatha Wendl*). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 6p., 2004. Disponível em: <[http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/sumario\\_v4\\_n2.htm](http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/sumario_v4_n2.htm)>. Acesso em: 02 mar. 2005.

- COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, p. 863-873, 1999.
- CUENCA, M. A. G.; RESENDE, J. M.; SAGGIN JUNIOR, O. J.; REIS, C. S. Mercado brasileiro do coco: Situação atual e perspectivas. In: ARAGÃO, W. M. (Org.). **Coco. Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 76p.
- D´SOUZA, 2006: Immobilized enzymes in bioprocess. Disponível em: <<http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles15.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2005.
- D´SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 52, p. 59-62, 2002.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DENG, H.-T.; XU, Z.-K.; LIU, Z.-M.; WU, J.; YE, P. Adsorption immobilization of *Candida rugosa* lipases on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 437-443, 2004.
- DEY, G.; CHAKRABORTY, M.; MITRA, A. Profiling C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> and C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> phenolic metabolites in *Cocos nucifera*. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 375-381, 2005.
- DEY, G.; NAGPAL, V.; BANERJEE, R. Immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus circulans* GRS 313 on coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102-103, p. 303-313, 2002.
- DEY, G.; SACHAN, A.; GHOSH, S.; MITRA, A. Detection of major phenolic acids from dried mesocarpic husk of mature coconut by thin layer chromatography. **Industrial Crops and Products**, v. 18, p. 171-176, 2003.
- DUMITRIU, E.; SECUNDO, F.; PATARIN, J.; FECHETE, I. Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 119-133, 2003.
- EGOROV, A. M.; KUROCHKINA, V. B.; SKLYARENKO, A. V.; NYS, P. S. Enzymatic transformation of betalactam antibiotics. Trends of development and approaches to practical implementation. **Vestnik Moskovskogo Universiteta. Khimiya**, v. 41, n<sup>o</sup> 6, p. 43- 46, 2000.
- ESTEVEZ, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, p. 798-806, 2004.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3. ed. Berlin: Springer, 1997. 402p.

FEIHRMANN, A. C. **Avaliação da atividade enzimática de lipases imobilizadas em fluidos pressurizados**. Erechim, 2005. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada – Campus Erechim.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. RODRÍGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA, F.; GUISÁN, J. M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, p. 181-189, 1999.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; BASTIDA, A.; COCA, J.; HARAMBOURE, T.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; TERRENI, M. GUISÁN, J. M. Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 649-656, 2001.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; COCCA, J.; MATEO, C.; MORO, P.; TERRENI, M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Régio-selective deprotection of peracetylated sugars via lipase hydrolysis. **Tetrahedron**, v. 59, p. 5705-5711, 2003.

FERREIRA, L.; RAMOS, M. A.; DORDICK, J. S.; GIL, M. H. Influence of different sílica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, p. 189-199, 2003.

FOGLER, H. S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. 892 p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. Database agricultural – production – crops primary – coconut. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 25 jun. 2005a.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. Compendium on Post-harvest Operations. Disponível em : <<http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch15.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2005b.

FORESTI, M. L.; ALIMENTI, G. A.; FERREIRA, M. L. Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: effect on the enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 338-349, 2005.

- FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107-108, p. 23-30, 2005.
- FREITAS, L.; MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação com lipase imobilizada em resíduo agroindustrial. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 52, nº 3, p. 124-128, 2003.
- GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Enzymatic synthesis of fatty esters Part I. Kinetic approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p.584-590, 1999.
- GELUK, M. A.; NORDE, W.; VAN KALSBECK, H. K. A. I.; VAN'T RIET, K., Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 748-754, 1992.
- GHAMGUI, H.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p. 355-363, 2004.
- GIORNO, L.; DRIOLI, E. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. **Tibtech**, v. 18, p. 339-349, 2000.
- GITLSEN, T.; BAUER, M.; ADLERCREUTZ, P. Adsorption of lipase on polypropylene powder. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1345, p. 188-196, 1997.
- GOMES, F. M.; SILVA, G. S.; PINATTI, D. G.; CONTE, R. A.; CASTRO, H. F. Wood cellulignin as an alternative matrix for enzyme immobilization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 255-268, 2005.
- GONÇALVES, L. R. B. **Estudo do processo de obtenção de etanol a partir de amido liquefeito, usando enzima e microrganismo coimobilizados em gel de pectina**. São Carlos, 1996. 114 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos.
- GUPTA, M. N.; ROY, I. Enzymes in organic media: Forms, functions and applications. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 2575-2583, 2004.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 17p., (PRELO), 2005.
- HARTUNG, E.; MARTINEC, M.; JUNGBLUTH, T. Biofilters – the influence of different filter materials and different operating conditions on the reduction efficiency. **Water Science and Technology**, v. 43, p. 253-260, 2001.
- HEINZE, T.; LIEBERT, T. Unconventional methods in cellulose functionalization. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1689-1762, 2001.

- HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 50-60, 1985 *apud* ARROYO, M.; SÁNCHE-MONTERO, J.M.S.; SINISTERRA, J.V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 3-12, 1999.
- HERNAIZ, M. J.; CROUT, D. H. G. Immobilization/stabilization on eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *B. circulans* and an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 26-32, 2000.
- HORNBY, W. E.; GOLDSTEIN, L. Immobilization of enzymes on nylon. **Methods in Enzymology**, v.44, p.118-134, 1976.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 11 de jul. 2005.
- ILLANES, A. Stability of biocatalysts. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, 1999. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol2/issue1/full/2>>. Acesso em: 15 ago. 2005.
- JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A.; MELO, E. H. M. The immobilization of enzymes and cells. **Chimicaoggi**, p. 21-29, 1988.
- KIRAN, K. R.; HARI KRISHNA, S.; SURESH BABU, C. V.; KARANTH, N. G.; DIVAKAR, S. An esterification method for determination of lipase activity. **Biotechnonology Letters**, v. 22, p. 1511-1514, 2000.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 81-87, 1987 *apud* DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- LANGONE, M. A.; DE ABREU, M. E.; REZENDE, M. J.; SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Enzymatic synthesis of médium chain monoglycerides in a solvent-free system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 100, p. 987-996, 2002.
- LEHNINGER, A. L. **Biochemistry: the molecular basis of cell structure and function**. New York: Worth, 1970, 833 p.
- LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; ALONSO, N. FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUÍSAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Preparation of a robust



---

biocatalyst of D-amino acid oxidase on sepabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 750-756, 2005.

LOZANO, P.; PÉREZ-MARÍN, A. B.; DE DIEGO, T.; GÓMEZ, D.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M. P.; RIOS, G. M.; IBORRA, J. L. Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. **Journal of Membrane Science**, v. 201, p. 55-64, 2002.

MACEDO, G. A.; LOZANO, M. M. S.; PASTORE, G. M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 72-75, 2003.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1258, p. 272-276, 1995.

MARTÍNEZ, I.; MARKOVITS, A.; CHAMY, R.; MARKOVITS, A. Lipase-catalyzed solvent-free transesterification of wood sterols. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 112, p. 55-62, 2004.

MARTINS, M. A.; KIYOHARA, P. K.; JOEKES, I. Scanning electron microscopy study of raw and chemically modified sisal fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 94, p. 2333-2340, 2004.

MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B. C. C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 456-462, 2005.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 509-515, 2000.

MAUGARD, T.; LEGOY, M. D. Enzymatic synthesis of derivatives of vitamin A in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 8, p. 275-280, 2000.

MUSIDLOWSKA-PERSSON, A.; BORNSCHEUER, U. T. Recombinant porcine intestinal carboxylesterase: cloning from the pig liver esterase gene by site-directed mutagenesis, functional expression and characterization. **Protein Engineering**, v. 16, p. 1139-1145, 2003.

NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 91, n. 3, p. 232-244, 2001.

- NAMASIVAYAM, C.; SANGEETHA, D. Removal of molybdate from water by adsorption onto ZnCl<sub>2</sub> activated coir pith carbon. **Bioresource Technology**, (PRELO) 2005.
- NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. Biotransformação de óleos e gorduras: Utilização de lipases para obtenção de biocombustível. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 19, p. 28-31, 2001.
- NCUBE, I.; READ, J. S. Evaluation of *Vernonia galamensis* lipase (acetone powder) for use in biotechnology. **Industrial Crops and Products**, v. 3, p. 285-292, 1995.
- NUNES, M. U. C. Fibra e pó da casca de coco: produtos de grande importância para a indústria e a agricultura. In: ARAGÃO, W. M. (Org.). **Coco. Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 76p.
- OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F.; MEI, L. H. I. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 23, p. 632-636, 2000.
- OLIVEIRA, P. C.; ALVEZ, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 63-71, 2000.
- OTERO, C.; BALLESTEROS, A.; GUISÁN, J.M. Immobilization/stabilization of lipase from *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 19, p. 163-175, 1988.
- PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204, 2000.
- PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different heterofunctional epoxy resins: Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, p. 201-210, 2003b.
- PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 279-286, 2002.
- PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 267-273, 2004.
- PALOMO, J. M.; PEÑAS, M. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; PISABARRO, A. G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RAMÍREZ, L.; GUISÁN, J. M.

Solid-phase handling of hydrophobins: immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 204-210, 2003a.

PALOMO, J. M.; SEGURA, R. L.; MATEO, C.; TERRENI, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, p. 869-874, 2005.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.

PARK, S. W.; LEE, J.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Enhancement of stability of GL-7-ACA acylase immobilized on silica gel modified by epoxide silanization. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 359-366, 2003.

PASSOS, P. R. A. **Destinação sustentável de cascas de coco (*Cocos nucifera*) verde: obtenção de telhas e chapas de partículas**. Rio de Janeiro, 2005. 186 p. Tese (Doutorado em Ciências em Planejamento Energético). Coordenação dos Programas de Pós-graduação de Engenharia – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

PENCREAC'H G.; BARATTI, J. C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 417-422, 1996.

PEREIRA, G. H. A. **Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil**. São Carlos, 1996. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos.

PETERSEN, M. T. N.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, p. 115-147, 2001.

PINO, G. A. H. **Biossorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco verde (*Cocos nucifera*)**. Rio de Janeiro, 2005. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

PIROZZI, D.; GRECO JUNIOR, G. Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 94-100, 2004.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 67-80, 1998.

- PLOU, F. J.; BARANDIARÁN, M.; CALVO, M. V.; BALLESTEROS, A.; PASTOR, E. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalysed hydrolysis of triolein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 66-71, 1996.
- PRABHU, G. N. Coir – Physical properties – Part I. **Coir**, v. 3, p. 29-32, 1959. *apud* BASAK, M. K.; BHADURI, S. K.; PAUL, N. B. Nature of the microbiologically extracted coir fiber from green coconut husks – An agro-waste. **Agricultural Wastes**, v. 5, p. 51-58, 1983.
- PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v.26, p. 738-744, 2003.
- RAHMAN, R. N. Z. R. A.; BAHARUM, S. N.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. High-yield purification of a organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. **Analytical Biochemistry**, v. 341, p. 267-274, 2005.
- RAJAN, M. Global market for industrial enzymes to reach \$2.4 million by 2009. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/editors/RC-147U.html>>. Acesso em: 20 dez. 2005.
- RAMÍREZ-LÓPEZ, E.; CORONA-HERNÁNDEZ, J.; DENDOOVEN, L.; RANGEL, P.; THALASSO, F. Characterization of five agricultural by-products as potencial biofilter carriers. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 259-263, 2003.
- REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, p. 140-143, 1998.
- ROBERTSON, D. E; STEER, B. A. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 141-149, 2004.
- ROCHA, C.; DUCSO, L.; GONÇALVES, M. P.; TEIXEIRA, J. A. Spent-grains and zeolites as potencial carriers for trypsin immobilisation. In: Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 4, 2005, Costa Verde. **CD-ROM de Anais do 4º Mercosur Congress on Process Systems Engineering**. Costa Verde: 2005, 5p.
- ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilised lipase in organic media. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 61-67, 1998.
- RODRIGUES, D. S., BEZERRA, T. G., BRUNO, L. M., GONÇALVES, L. R. B., Imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em suporte hidrofóbico. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 15, 2004, Curitiba. **CD-ROM de Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Curitiba: 2004, 8p.
- RODRIGUES, D. S. **Estudo da imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em carvão ativado e quitosana**. Fortaleza, 2005. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará.

- ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P. **Água de coco: métodos de conservação**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT/SEBRAE/CE, 2000.40p. (Documentos, 37)
- ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; BRÍGIDA, A. I. S.; BRÍGIDO, A. K. L. Aproveitamento de resíduos da indústria da água de coco verde como substrato agrícola: 2 - Aplicação na produção de mudas. In: Seminário Nacional de Resíduos Sólidos, VI, 2002, Gramado. **CD-ROM do VI Seminário Nacional de Resíduos Sólidos**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, 2002a, 5p.
- ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; SANTOS, F. J. S.; ABREU, F. A. P.; FURTADO, A. A. L.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R. V. **Utilização da casca de coco como substrato agrícola**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002b. 22p. (Documentos, 52).
- ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; BRÍGIDA, A. I. S.; BRÍGIDO, A. K. L. Aproveitamento de resíduos da indústria da água de coco verde como substrato agrícola: 1 – Processo de obtenção. In: Seminário Nacional de Resíduos Sólidos, VI, 2002, Gramado. **CD-ROM do VI Seminário Nacional de Resíduos Sólidos**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, 2002c, 5p.
- ROZMAN, H. D.; TAN, K. W.; KUMAR, R. N.; ABUBAKAR, A.; MOHD. ISHAK, Z. A.; ISMAIL, H. The effect of lignin as a compatibilizer on the physical properties of coconut fiber-polypropylene composites. **European Polymer Journal**, v. 36, p. 1483-1494, 2000.
- SALIS, A.; PINNA, M. C.; MURGIA, S.; MONDUZZI, M. Novel mannitol based non-ionic surfactants from biocatalysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 139-146, 2004.
- SANDOVAL, G.; CONDORET, J. S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Esterification by immobilized lipase in solvent-free media: kinetic and thermodynamic arguments. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, p. 313-320, 2002.
- SAVASTANO JUNIOR, H.; LUZ, P. H. C.; NOLASCO, A. M. Seleção de resíduos de alguns tipos de fibra vegetal, para reforço de componentes de construção. In: Encontro Nacional sobre Edificações e Comunidades Sustentáveis, 1997, Canela. **Anais do Encontro Nacional sobre Edificações e Comunidades Sustentáveis**. Porto Alegre: Antac/UFRGS, 1997, p. 107-112. Disponível em: <<http://www.usp.br/fzea/FZEA/fzea/zaz/laboratorio/frsr.htm>>. Acesso em: 29 maio 2004.
- SECUNDO, F.; CARREA, G. Lipase activity and conformation in neat organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 93-102, 2002.
- SECUNDO, F.; CARREA, G.; SOREGAROLI, C.; VARINELLI, D.; MORRONE, R. Activity of different *Candida antarctica* lipase B formulations in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 157-163, 2001.

- SELVAM, A.; NAIR, N. G.; SINGH, P. Synthesis and characterization of SiC whiskers from coconut shells. **Journal of Materials Science Letters**, v. 17, p. 57-60, 1998.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SHUKLA, S. R.; PAI, R. S. Adsorption of Cu(II), Ni(II) and Zn(II) on modified jute fibres. **Bioresource Technology**, 9p., (PRELO), 2005.
- SHULER, M. L; KARGI, F. **Bioprocess engineering: basic concepts** . Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall, 1992. 479p
- SILVA, G. C.; SOUZA, D. A. DE; MACHADO, J. C.; HOURSTON, D. J. Mechanical and thermal characterization of native brazilian coir fiber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, p. 1197-1206, 2000.
- SILVA, F. M; LACERDA, P. S. B.; JONES JUNIOR, J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, v. 28, p. 103-110, 2005.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; OLIVO, J. E.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 69-79, 2004.
- SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, v. 26, p. 832-838, 2003.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Otimização por planejamento experimental da imobilização da lipase microbiana em sílica de porosidade controlada na presença de polietilenoglicol. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 14, 2002, Natal. **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Natal: 2002.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v 77-79, p. 745-757, 1999.
- SROKA, Z. The activity of lipase from *Rhizopus* sp. in native form and after immobilization on hollow-fiber membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 97, p. 209-214, 1994.
- STAMAKIS, H.; XANAKIS, A. Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, p. 399-406, 1999.
- STARK, M-B.; HOLMBERG, K. Covalent immobilization of lipase in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 942-950, 1989.

- STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 548-556, 2002.
- SZCZESNA-ANTEZAK, M.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; BIELECKI, S. Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 261-268, 2002.
- TOLEDO FILHO, R. D.; GHAVAMI, K.; ENGLAND, G. L.; SCRIVENER, K. Development of vegetable fibre-mortar composites of improved durability. **Cement & Concrete Composites**, v. 25, p. 185-196, 2003.
- TOLEDO FILHO, R. D.; GHAVAMI, K.; SANJUÁN, M. A.; ENGLAND, G. L. Free, restrained and drying shrinkage of cement mortar composites reinforced with vegetable fibres. **Cement & Concrete Composites**, v.27, p.537-546, 2005.
- TSUJITA, T.; NAKAGAWA, A.; SHIRAI, K.; SAITO, Y.; OKUDA, H. Methyl butyrate-hydrolyzing activity of hepatic triglyceride lipase from rat post-heparin plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 11215-11220, 1984.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v.2, p. 293-308, 1994.
- UPPENBERG, J.; OHRNER, N.; NORIN, M.; HULT, K.; KLEYWEGT, G. J.; PATKAR, S.; WAAGEN, V.; ANTHONSEN, T.; JONES, T. A. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**, v. 34, p. 16838-16851, 1995.
- URIOSTE, D. **Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta**. Lorena, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena.
- VAN DAM, J. E. G.; VAN DEN OEVER, M. J. A.; TEUNISSEN, W.; KEIJSERS, E. R. P.; PERALTA, A. G. Process for production of high density/high performance binderless boards from whole coconut husk. Part 1: Lignin as intrinsic thermosetting binder resin. **Industrial Crops and Products**, v. 19, p. 207-216, 2004.
- VAN GROENESTIJN, J. W.; KRAAKMAN, N. J. R. Recent developments in biological waste gas purification in Europe. **Chemical Engineering Journal**, (PRELO) 2005.
- VEREDAS, V. **Purificação da  $\alpha$ -Lactalbumina a partir do Soro de Queijo em Leito Fixo e Expandido de Resinas**. Campinas, 2000. 91 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- VERMUË, M. H.; TRAMPER, J. Biocatalysis in non-conventional media: Médium engineering aspects. **Pure & Applied Chemistry**, v. 67, nº 2, p. 345-373, 1995.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

WAMBUA, P.; IVENS, J.; VERPOEST, I. Natural fibres: can they replace glass in fibre reinforced plastics? **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 1259-1264, 2003.

WIKIPÉDIA. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/ISO\\_9000](http://pt.wikipedia.org/wiki/ISO_9000)>. Acesso em: 11 jan. 2006.

YESILOGLU, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2155-2159, 2005.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglucosidade imobilizada**. 1989. 454 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ZAKS, A. Industrial biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 130-136, 2001.



## APÊNDICE A

### A.1 ALTERNATIVAS DE APROVEITAMENTO DO RESÍDUO CASCA DE COCO VERDE

**Tabela A.1:** Algumas referências bibliográficas de estudos realizados utilizando casca de coco verde e seus derivados para variados fins.

Ano	Referência Bibliográfica
	DEY, G.; CHAKRABORTY, M.; MITRA, A. Profiling C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> and C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> phenolic metabolites in <i>Cocos nucifera</i> . <b>Journal of Plant Physiology</b> , v. 162, p. 375-381, 2005.
	LIZ, R. S.; VIDAL, M. C.; CARRIJO, O. A.; VIEIRA, C. M. Enriquecimento com calcário e tempo de compostagem da fibra de coco verde sobre a produção de mudas de tomateiro. Disponível em: < <a href="http://200.210.234.180/HORTA/Download/Biblioteca/44_379.pdf">http://200.210.234.180/HORTA/Download/Biblioteca/44_379.pdf</a> >. Acesso em: 13 jul. 2005.
2005	LIZ, R. S.; VIDAL, M. C.; CARRIJO, O. A.; VIEIRA, C. M. Produção de mudas de tomateiro em diferentes substratos a base de fibra de coco verde. Disponível em: < <a href="http://200.210.234.180/HORTA/Download/Biblioteca/olfi4014.pdf">http://200.210.234.180/HORTA/Download/Biblioteca/olfi4014.pdf</a> >. Acesso em: 13 jul. 2005.
	PASSOS, P. R. A. <b>Destinação sustentável de cascas de coco (<i>Cocos nucifera</i>) verde: obtenção de telhas e chapas de partículas</b> . Rio de Janeiro, 2005. 186 p. Tese (Doutorado em Ciências em Planejamento Energético). Coordenação dos Programas de Pós-graduação de Engenharia – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
	PINO, G. A. H. <b>Biossorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco verde (<i>Cocos nucifera</i>)</b> . Rio de Janeiro, 2005. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.
2004	CORDÃO TERCEIRO NETO, C. P.; FERREIRA, F. F. H.; BEZERRA, F. C.; SOUSA, R. F.; CAVALCANTI, M. L. F. Efeito de diferentes substratos na aclimatização “ex-vitro” de mudas de Violeta Africana ( <i>Saintpaulia ionatha Wendl</i> ). <b>Revista de Biologia e Ciências da Terra</b> , v. 4, n. 2, 6p., 2004. Disponível em: < <a href="http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/sumario_v4_n2.htm">http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/sumario_v4_n2.htm</a> >. Acesso em: 02 mar. 2005.

**Tabela A.1:** Algumas referências bibliográficas de estudos realizados utilizando casca de coco verde e seus derivados para variados fins (Continuação).

Ano	Referência Bibliográfica
2003	DANTAS, A. M.; ANDRADE, A. M. R.; PINTO, G. A. S.; BRUNO, L. M. <b>Fermentação semi-sólida de casca de coco verde para produção de tanase por <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Aspergillus niger</i>.</b> In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia 2003. Florianópolis: v.1, 2003.
	BRÍGIDA, A. I. S.; ROSA, M. F. Determinação do teor de taninos na casca de coco verde ( <i>Cocos nucifera</i> L.). <b>Proceedings of The Interamerican Society For Tropical Horticulture</b> , v.47, p. 25-27, 2003.
	CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca de coco verde como substrato agrícola. <b>Horticultura Brasileira</b> . Brasília, v.20, p.533-535, 2002.
	ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; SANTOS, F. J. S.; ABREU, F. A. P.; FURTADO, A. A. L.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R. V. <b>Utilização da casca de coco como substrato agrícola.</b> Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002b. 22p. (Documentos, 52).
2002	ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; BRÍGIDA, A. I. S.; BRÍGIDO, A. K. L. <b>Aproveitamento de resíduos da indústria da água de coco verde como substrato agrícola: 1 – Processo de obtenção.</b> In: VI Seminário Nacional de Resíduos Sólidos, 2002, Gramado. CD-ROM do VI Seminário Nacional de Resíduos Sólidos. Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, 2002.
	ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; BRÍGIDA, A. I. S.; BRÍGIDO, A. K. L. <b>Aproveitamento de resíduos da indústria da água de coco verde como substrato agrícola: 2 - Aplicação na produção de mudas.</b> In: VI Seminário Nacional de Resíduos Sólidos, 2002, Gramado. CD-ROM do VI Seminário Nacional de Resíduos Sólidos. Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, 2002.
2001	COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. DE F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde. <b>Boletim CEPPA</b> , v.19, nº1, p.33-42, 2001.

**Tabela A.1:** Algumas referências bibliográficas de estudos realizados utilizando casca de coco verde e seus derivados para variados fins (Continuação).

Ano	Referência Bibliográfica
2001	ROSA, M. F., BEZERRA, F. C., ARAÚJO, F. B. S., NORÕES, E. R. Utilização do pó da casca de coco verde na germinação de alface hidropônico. <b>Horticultura Brasileira</b> , Brasília, v.19, n.2. p.294. Suplemento CD-ROM. Edição de Anais do 41º Congresso Brasileiro de Olericultura, Brasília, DF, julho, 2001.
1998	SELVAM, A.; NAIR, N. G.; SINGH, P. Synthesis and characterization of SiC whisker from coconut shells. <b>Journal of Materials Science Letters</b> , v.17, p.57-60, 1998.

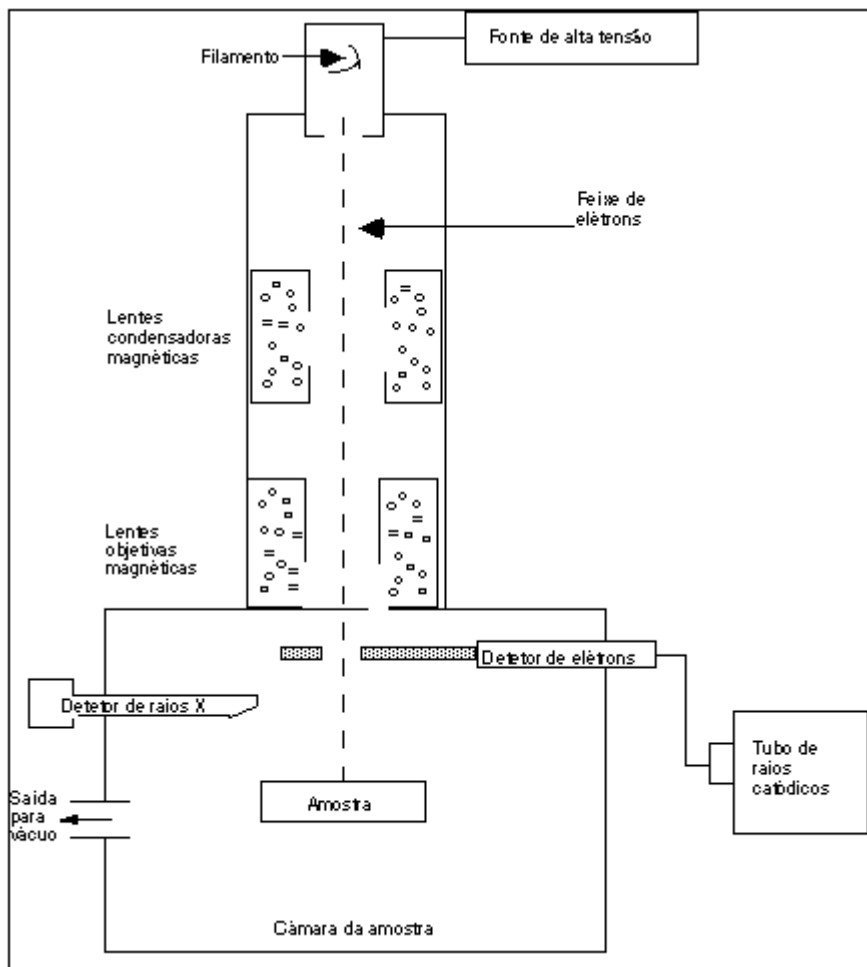
---

## APÊNDICE B

### **B.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NA OBTENÇÃO DE FOTOGRAFIAS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Para realizar a visualização dos suportes e/ou derivados através da microscopia eletrônica de varredura, inicialmente, submeteu-se à secagem a vácuo por 10 minutos o material a ser analisado e procedeu-se a estocagem dos mesmos embalados em papel alumínio até o dia da análise.

A visualização do suporte por microscopia eletrônica (Figura B.1) só é possível após a metalização do mesmo para que este sofra um bombardeio de feixe de elétrons altamente energético e a imagem deste seja formada através da emissão de elétrons secundários e raios X pela amostra no estado excitado e do retro-espalhamento de elétrons primários originados de colisões inelásticas com o sólido em análise (SOUZA, 1996). Para a metalização, uma pequena amostra do suporte e/ou derivado a ser analisado foi colada, com uma leve pincelada de cola de prata (Prata condutora 200-B, Degussa, S.A.), em suportes metálicos específicos para a realização de microscopia, recobertos com papel alumínio. Posteriormente, a amostra é submetida à secagem a temperatura ambiente por 20 minutos e recobertas com banho de ouro (99,99%) em um metalizador (EMITECH K550, ver Figura B.2). Após a metalização, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM 940 A, ver Figura B.3) operando a 10 kV.



**Figura B.1:** Configuração esquemática da parte interna de um microscópio eletrônico de varredura (SOUZA, 1996).



**Figura B.2:** Metalizador EMITECH, modelo K 550, utilizado para recobrimento da amostra com ouro.



- (a) Microscópio eletrônico
- (b) Painel de controle



**Figura B.3:** Microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo DSM 940A, utilizado nas análises de microscopia eletrônica do suporte e/ou do derivado.

## B.2 REFERÊNCIAS

SOUZA, L. A. C. **Evolução da tecnologia de policromia nas esculturas em Minas Gerais no Século XVIII: O interior inacabado da Igreja Matriz de Nossa Senhora da Conceição, em Catas Altas do Mato Dentro, um monumento exemplar.** Belo Horizonte, 1996. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais.

## APÊNDICE C

### C.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL E DISTRIBUIÇÃO DE POROS DAS FIBRAS UTILIZADAS COMO SUPORTE

Para a determinação da área superficial e distribuição de poros das fibras analisadas, uma massa da amostra foi selecionada, baseando-se na sensibilidade do equipamento (Autorsorb-1 MP, Quantachrome), que varia entre 5 e 20 m<sup>2</sup> de área superficial contida na amostra. Logo, a quantidade em gramas estará sempre relacionada a esta faixa. No caso específico da fibra de coco, fez-se uso de 1,5 grama de fibra.

Após a pesagem, a amostra foi colocada na célula de análise e submetida à regeneração, à temperatura de 100°C, por um período de 23 horas. A regeneração tem por objetivo ausentar a amostra de umidade ou qualquer outra substância adsorvida. Antes de iniciar a análise de área superficial, foi realizado um “auto-teste” no qual o equipamento avalia se de fato a amostra foi regenerada.

Em mãos de uma amostra regenerada, a célula de análise foi submergida em nitrogênio líquido, de forma que a temperatura no qual o experimento ocorreu foi de 77,3 K. Após a formação de vácuo no sistema, iniciou-se a injeção de gás nitrogênio, cuja área é de 16,2 Å<sup>2</sup>/molécula, sendo o sistema submetido a degraus de pressão estipulados pelo usuário para que ocorra a adsorção gradual do nitrogênio na amostra. A partir da quantidade de nitrogênio adsorvida por degrau de pressão provocado, construiu-se, através do software do próprio equipamento, as isotermas de adsorção e dessorção, a partir das quais foi possível determinar a área superficial da fibra analisada. A área aparente obtida foi de 0,6569 m<sup>2</sup>/g. Considerando que foram utilizados 1,5 g de fibra, estima-se que apenas 0,985 m<sup>2</sup> foram fornecidos para leitura. Tal valor encontra-se fora da sensibilidade do aparelho, o que torna o valor de área fornecido não confiável.

## APÊNDICE D

### D.1 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 7 CONSIDERANDO A VARIÁVEL ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO DERIVADO.

**Tabela D.1:** ANOVA do planejamento 2<sup>3</sup> para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica sem interações ( $R^2 = 0,70972$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
Curvatura	23,2868	1	23,2868	53,8484	0,086224
X <sub>1</sub>	<b>131,3820</b>	<b>1</b>	<b>131,3820</b>	<b>303,8086</b>	<b>0,036484</b>
X <sub>2</sub>	2,0402	1	2,0402	4,7178	0,274680
X <sub>3</sub>	32,8050	1	32,8050	75,8585	0,072775
Erro Puro	0,4325	1	0,4325		
Total	267,0272	9			

**Tabela D.2:** ANOVA do planejamento 2<sup>3</sup> para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica com duas interações ( $R^2 = 0,99517$ ).

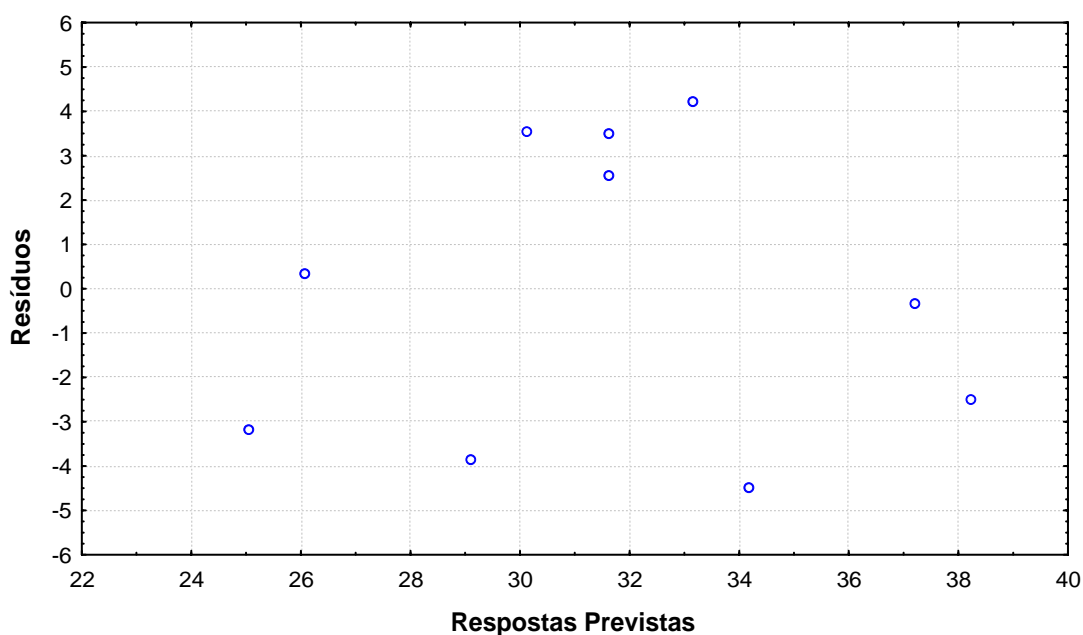
Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
Curvatura	23,2868	1	23,2868	53,8484	0,086224
X <sub>1</sub>	<b>131,3820</b>	<b>1</b>	<b>131,3820</b>	<b>303,8086</b>	<b>0,036484</b>
X <sub>2</sub>	2,0402	1	2,0402	4,7178	0,274680
X <sub>3</sub>	32,8050	1	32,8050	75,8585	0,072775
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	59,2960	1	59,2960	137,1165	0,054235
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	3,3025	1	3,3025	7,6366	0,221039
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	13,6242	1	13,6242	31,5047	0,112243
Erro Puro	0,4325	1	0,4325		
Total	267,0272	9			



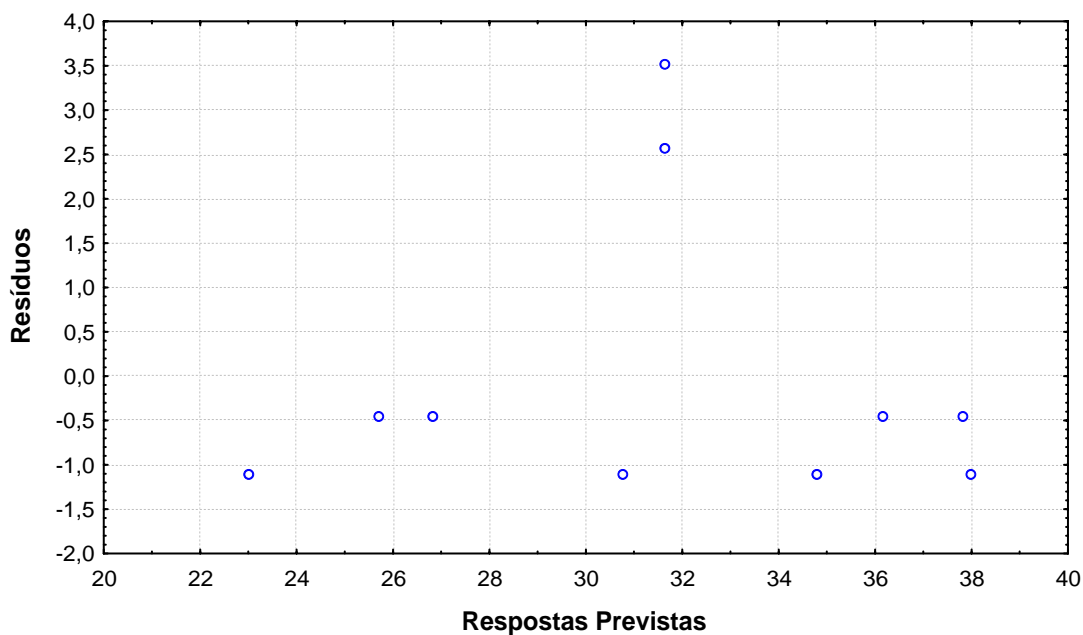
**Tabela D.3:** ANOVA do planejamento  $2^3$  para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica com três interações ( $R^2 = 0,99838$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
Curvatura	23,2868	1	23,2868	53,8484	0,086224
X <sub>1</sub>	<b>131,3820</b>	<b>1</b>	<b>131,3820</b>	<b>303,8086</b>	<b>0,036484</b>
X <sub>2</sub>	2,0402	1	2,0402	4,7178	0,274680
X <sub>3</sub>	32,8050	1	32,8050	75,8585	0,072775
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	59,2960	1	59,2960	137,1165	0,054235
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	3,3025	1	3,3025	7,6366	0,221039
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	13,6242	1	13,6242	31,5047	0,112243
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,8581	1	0,8581	1,9842	0,393020
Erro Puro	0,4325	1	0,4325		
Total	267,0272	9			

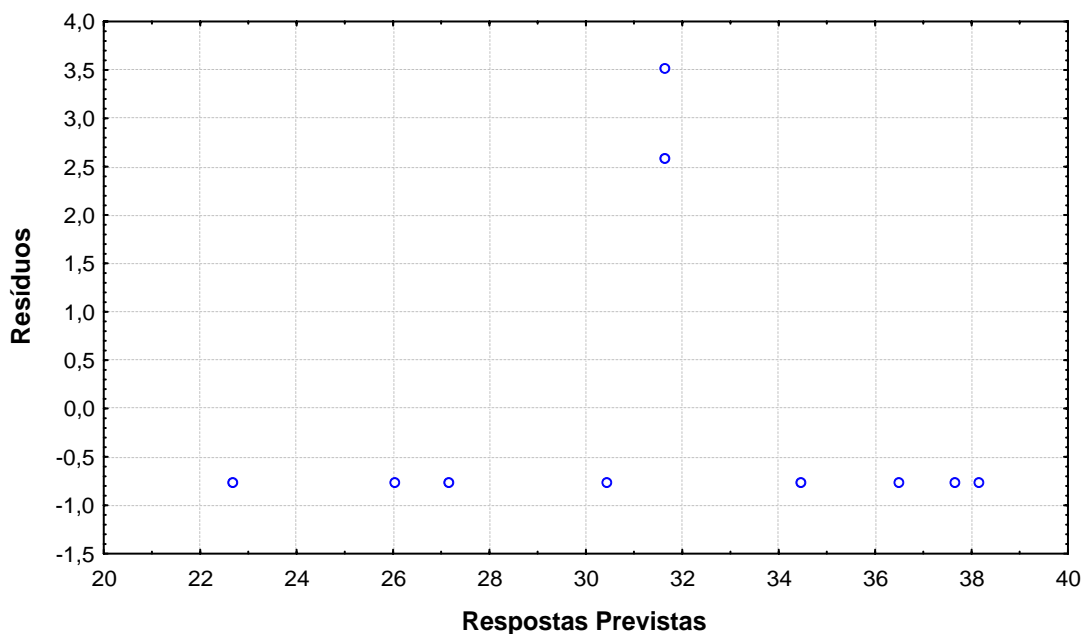
**D.2 GRÁFICO DOS RESÍDUOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$  REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 7 CONSIDERANDO A VARIÁVEL ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO DERIVADO.**



**Figura D.1:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando não haver interação entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 16,79999).



**Figura D.2:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando duas interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 8,19242).



**Figura D.3:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando três interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 11,85961).

**D.3 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 7 CONSIDERANDO A VARIÁVEL CONVERSÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO.**

**Tabela D.4:** ANOVA do planejamento 2<sup>3</sup> para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico sem interações ( $R^2 = 0,82284$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
Curvatura	6,88070	1	6,88070	10,22697	0,192938
X <sub>1</sub>	4,13281	1	4,13281	6,14271	0,244144
X <sub>2</sub>	15,70801	1	15,70801	23,34722	0,129919
X <sub>3</sub>	0,52531	1	0,52531	0,78079	0,539284
Erro Puro	0,67280	1	0,67280		
Total	33,11309	9			

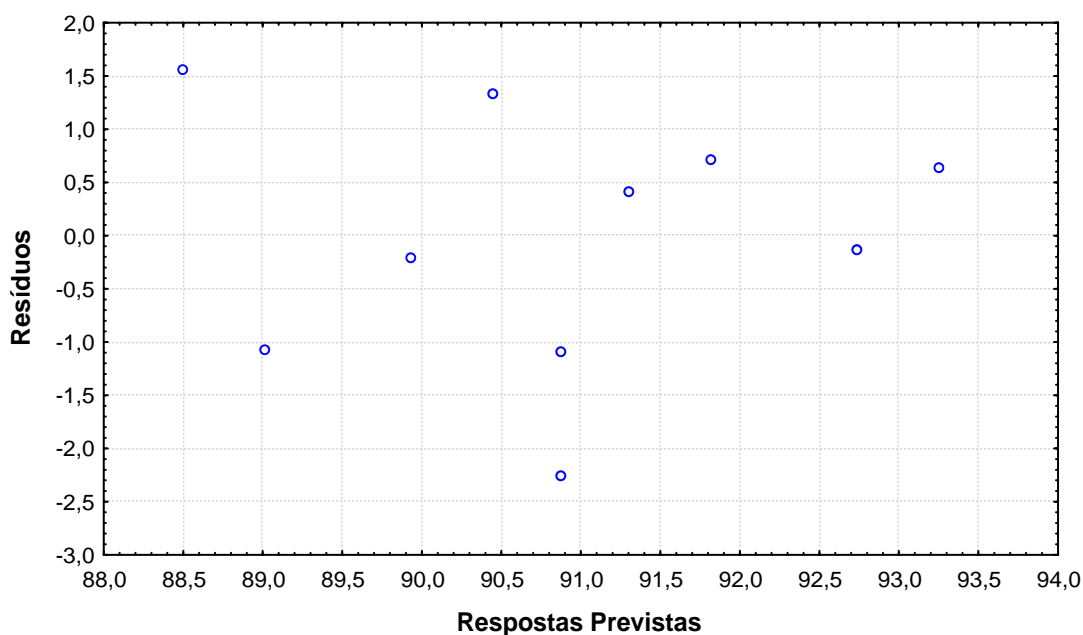
**Tabela D.5:** ANOVA do planejamento 2<sup>3</sup> para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico com duas interações ( $R^2 = 0,92828$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
Curvatura	6,88070	1	6,88070	10,22697	0,192938
X <sub>1</sub>	4,13281	1	4,13281	6,14271	0,244144
X <sub>2</sub>	15,70801	1	15,70801	23,34722	0,129919
X <sub>3</sub>	0,52531	1	0,52531	0,78079	0,539284
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,18911	1	0,18911	0,28108	0,689652
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2,70281	1	2,70281	4,01726	0,294619
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,59951	1	0,59951	0,89107	0,518345
Erro Puro	0,67280	1	1,70201		
Total	33,11309	9	0,67280		

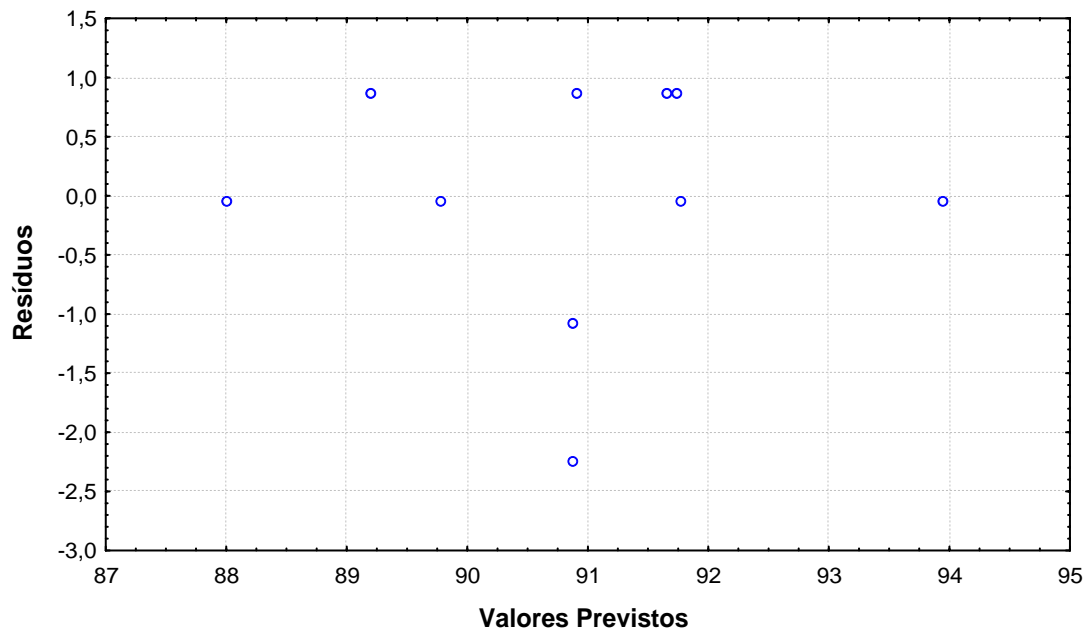
**Tabela D.6:** ANOVA do planejamento  $2^3$  para imobilização a pH 7 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico com três interações ( $R^2 = 0,97968$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	P
Curvatura	6,88070	1	6,88070	10,22697	0,192938
X <sub>1</sub>	4,13281	1	4,13281	6,14271	0,244144
X <sub>2</sub>	15,70801	1	15,70801	23,34722	0,129919
X <sub>3</sub>	0,52531	1	0,52531	0,78079	0,539284
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,18911	1	0,18911	0,28108	0,689652
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2,70281	1	2,70281	4,01726	0,294619
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,59951	1	0,59951	0,89107	0,518345
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1,70201	1	1,70201		
Erro Puro	0,67280	1	0,67280		
Total	33,11309	9			

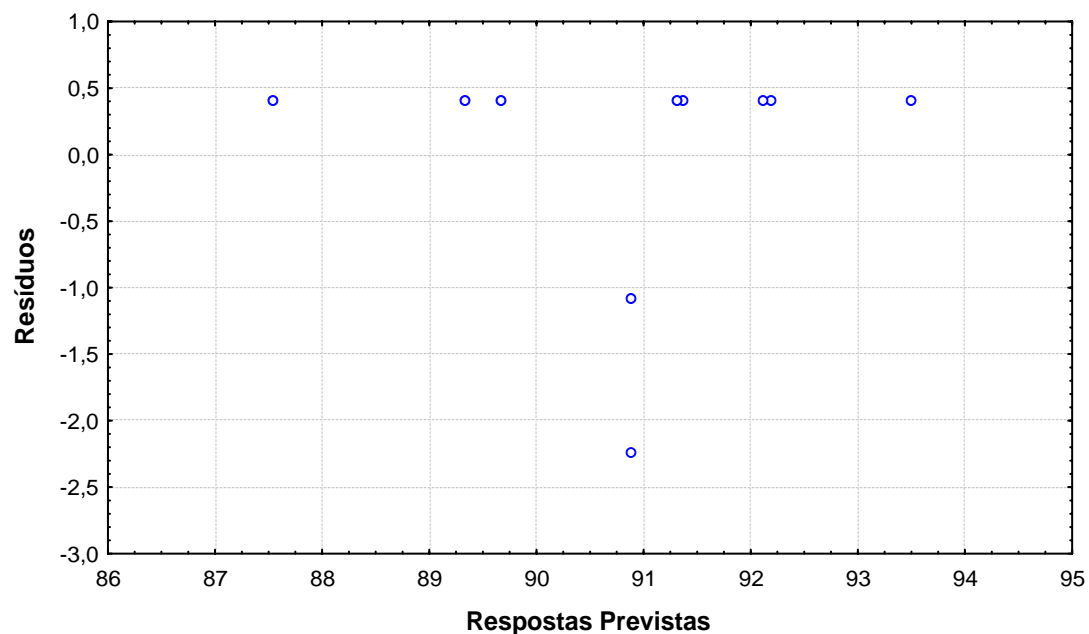
**D.4 GRÁFICO DOS RESÍDUOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$  REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 7 CONSIDERANDO A VARIÁVEL CONVERSÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO.**



**Figura D.4:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando não haver interação entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 2,124492).



**Figura D.5:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando duas interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 3,085172).



**Figura D.6:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 7, considerando três interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 3,776751).

**D.5 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 10 CONSIDERANDO A VARIÁVEL ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO DERIVADO.**

**Tabela D.7:** ANOVA do planejamento 2<sup>3</sup> para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica sem interações ( $R^2 = 0,62951$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
Curvatura	3,5402		3,54025	1,02365	0,496280
X <sub>1</sub>	85,2818	1	85,28180	24,65897	0,126509
X <sub>2</sub>	11,6644	1	11,66445	3,37274	0,317432
X <sub>3</sub>	13,1072	1	13,10720	3,78991	0,302092
Erro Puro	3,4585	1	3,45845		
Total	180,4478	9			

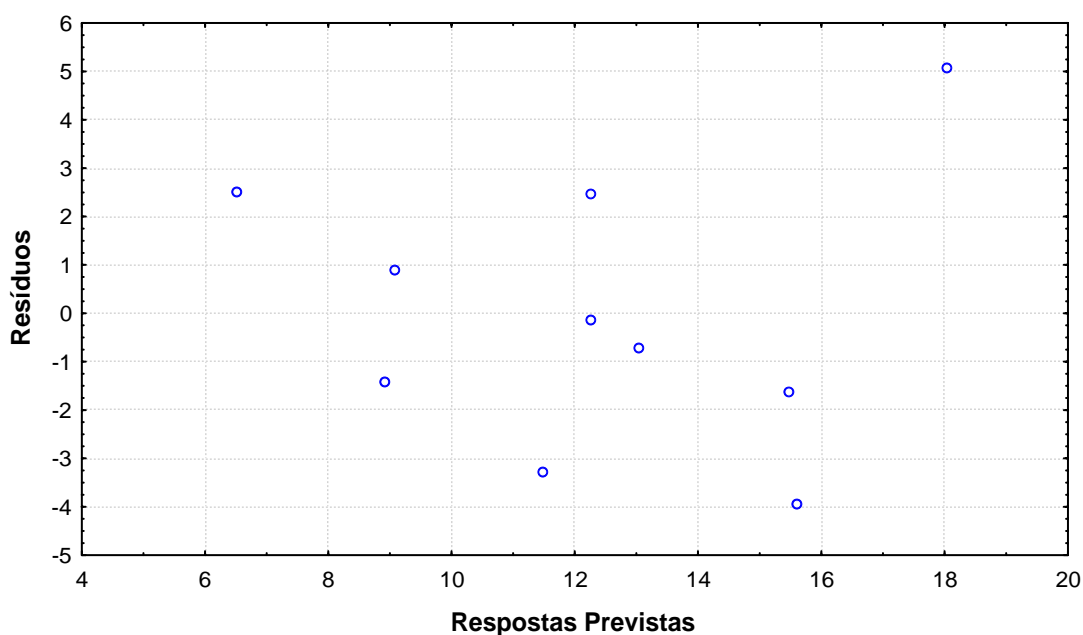
**Tabela D.8:** ANOVA do planejamento 2<sup>3</sup> para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica com duas interações ( $R^2 = 0,90905$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
Curvatura	3,5402	1	3,54025	1,02365	0,496280
X <sub>1</sub>	85,2818	1	85,28180	24,65897	0,126509
X <sub>2</sub>	11,6644	1	11,66445	3,37274	0,317432
X <sub>3</sub>	13,1072	1	13,10720	3,78991	0,302092
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	32,8050	1	32,80500	9,48546	0,199869
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	6,0204	1	6,02045	1,74079	0,412882
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	11,6162	1	11,61620	3,35879	0,317987
Erro Puro	3,4585	1	3,45845		
Total	180,4478	9			

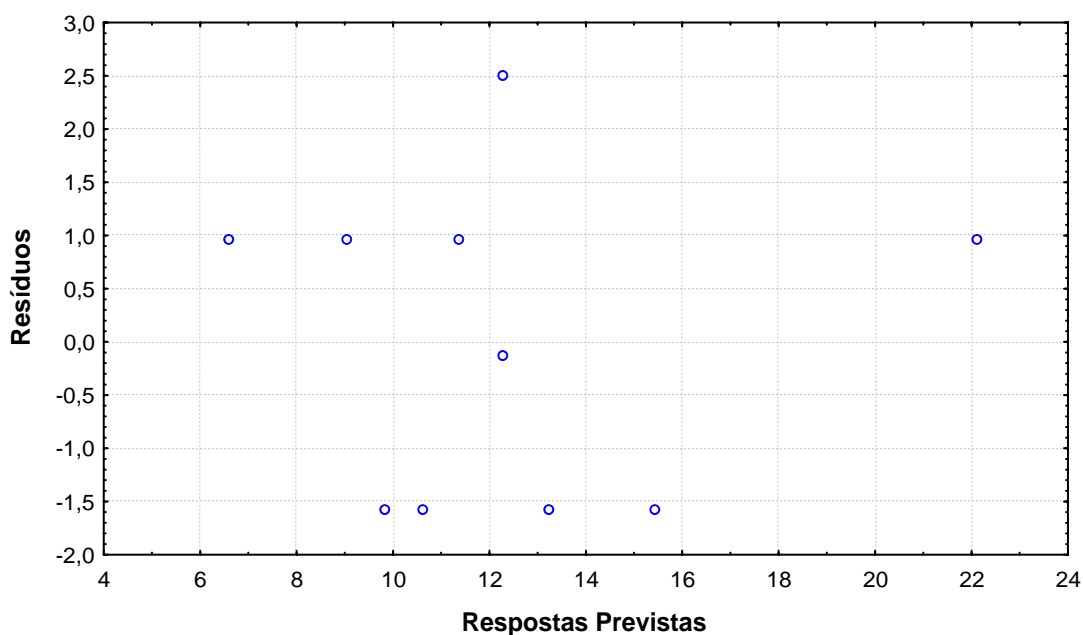
**Tabela D.9:** ANOVA do planejamento  $2^3$  para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta atividade hidrolítica com três interações ( $R^2 = 0,98083$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	P
Curvatura	3,5402	1	3,54025	1,02365	0,496280
$X_1$	85,2818	1	85,28180	24,65897	0,126509
$X_2$	11,6644	1	11,66445	3,37274	0,317432
$X_3$	13,1072	1	13,10720	3,78991	0,302092
$X_1X_2$	32,8050	1	32,80500	9,48546	0,199869
$X_1X_3$	6,0204	1	6,02045	1,74079	0,412882
$X_2X_3$	11,6162	1	11,61620	3,35879	0,317987
$X_1X_2X_3$	12,9541	1	12,95405	3,74562	0,303615
Erro Puro	3,4585	1	3,45845		
Total	180,4478	9			

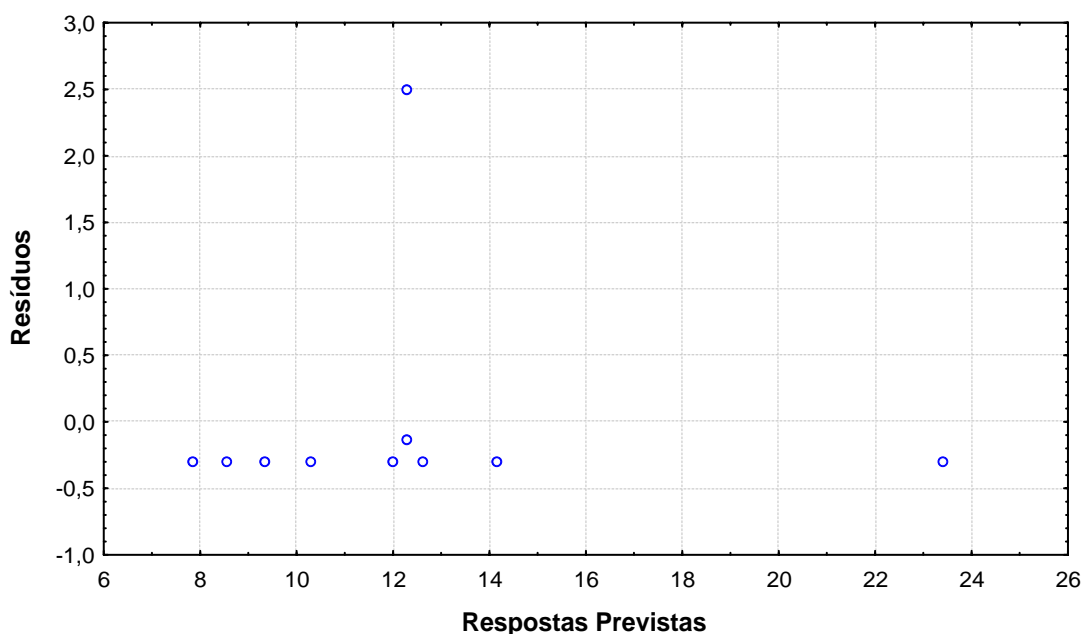
#### D.6 GRÁFICO DOS RESÍDUOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL $2^3$ REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 10 CONSIDERANDO A VARIÁVEL ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO DERIVADO.



**Figura D.7:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando não haver interação entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 11,7324).



**Figura D.8:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando duas interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 6,650917).



**Figura D.9:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para atividade hidrolítica do derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando três interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 3,49935).



## D.7 ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup> REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 10 CONSIDERANDO A VARIÁVEL CONVERSÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO.

**Tabela D.10:** ANOVA do planejamento 2<sup>3</sup> para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico sem interações ( $R^2 = 0,8985$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
Curvatura	121,3477	1	121,3477	6,17343	0,243594
X <sub>1</sub>	737,4720	1	737,4720	37,51807	0,103026
X <sub>2</sub>	6,5703	1	6,5730	0,33426	0,666285
X <sub>3</sub>	6,5703	1	6,5703	0,33426	0,666285
Erro Puro	19,6564	1	19,7109		
Total	970,4606	9			

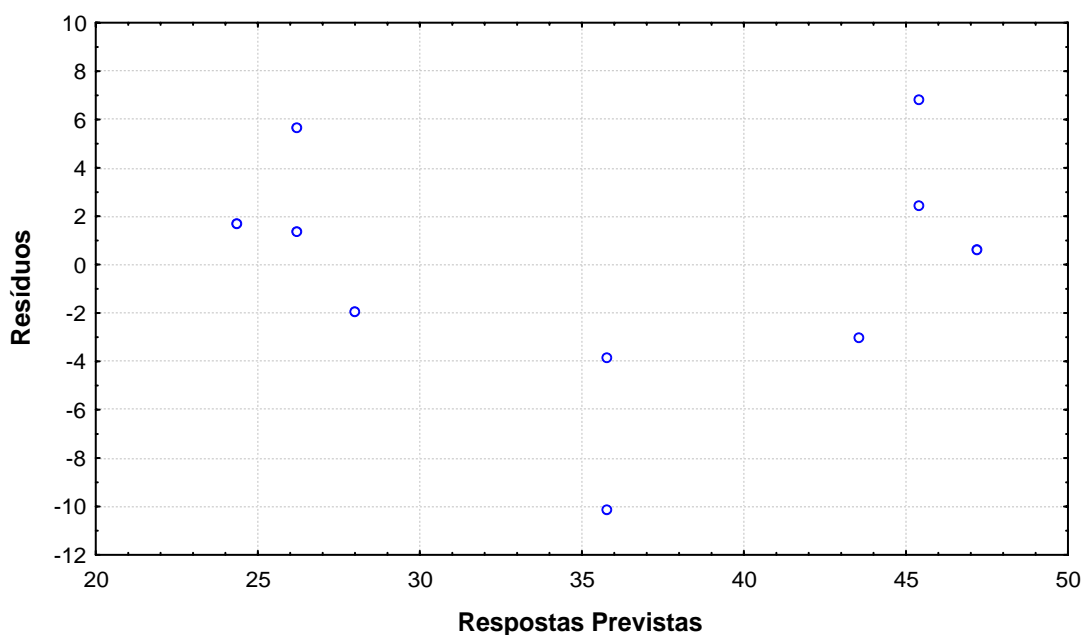
**Tabela D.11:** ANOVA do planejamento 2<sup>3</sup> para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico com duas interações ( $R^2 = 0,97731$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	P
Curvatura	121,3477	1	121,3477	6,17343	0,243594
X <sub>1</sub>	737,4720	1	737,4720	37,51807	0,103026
X <sub>2</sub>	6,5703	1	6,5730	0,33426	0,666285
X <sub>3</sub>	6,5703	1	6,5703	0,33426	0,666285
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,2628	1	0,2628	0,01337	0,926713
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	31,8003	1	31,8003	1,61781	0,424163
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	44,4153	1	44,4153	2,25958	0,373710
Erro Puro	19,6564	1	19,6564		
Total	970,4606	9			

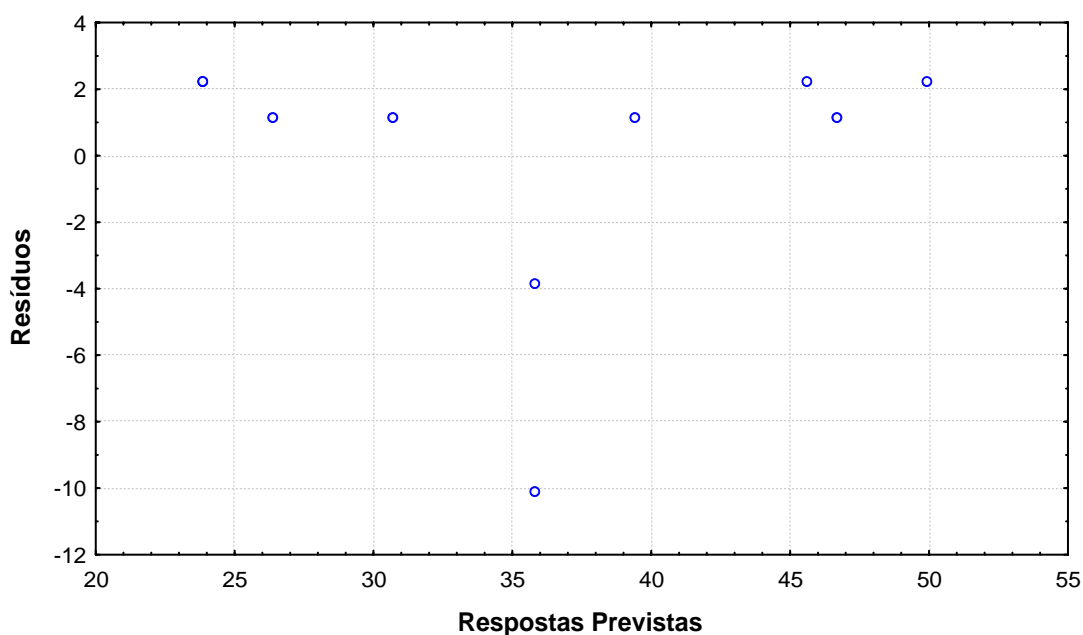
**Tabela D.12:** ANOVA do planejamento  $2^3$  para imobilização a pH 10 considerando o modelo da variável resposta conversão de ácido butírico com três interações ( $R^2 = 0,97975$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	p
Curvatura	121,3477	1	121,3477	6,17343	0,243594
$X_1$	737,4720	1	737,4720	37,51807	0,103026
$X_2$	6,5703	1	6,5730	0,33426	0,666285
$X_3$	6,5703	1	6,5703	0,33426	0,666285
$X_1X_2$	0,2628	1	0,2628	0,01337	0,926713
$X_1X_3$	31,8003	1	31,8003	1,61781	0,424163
$X_2X_3$	44,4153	1	44,4153	2,25958	0,373710
$X_1X_2X_3$	2,3653	1	2,3653	0,12033	0,787432
Erro Puro	19,6564	1	19,6564		
Total	970,4606	9			

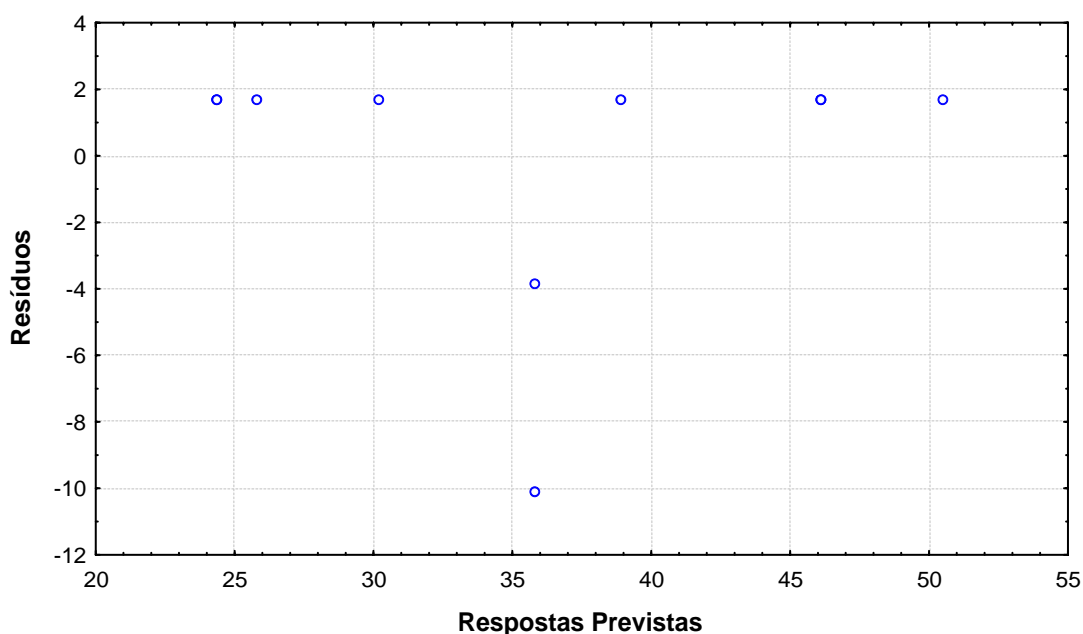
**D.8 GRÁFICO DOS RESÍDUOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$  REALIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO LIPASE EM FIBRA DE COCO POR LIGAÇÃO COVALENTE A pH 10 CONSIDERANDO A VARIÁVEL CONVERSÃO DE ÁCIDO BUTÍRICO.**



**Figura D.10:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando não haver interação entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 36,64132).



**Figura D.11:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando duas interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 47,78983).



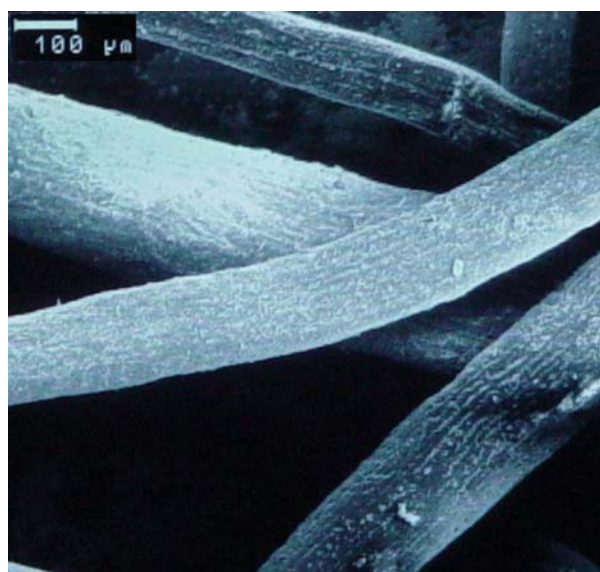
**Figura D.12:** Resíduos das respostas previstas pelo modelo obtido através do planejamento fatorial  $2^3$  para conversão de ácido butírico realizada pelo derivado obtido por imobilização a pH 10, considerando três interações entre as variáveis independentes (Média quadrática residual = 70,50209).

## APÊNDICE E

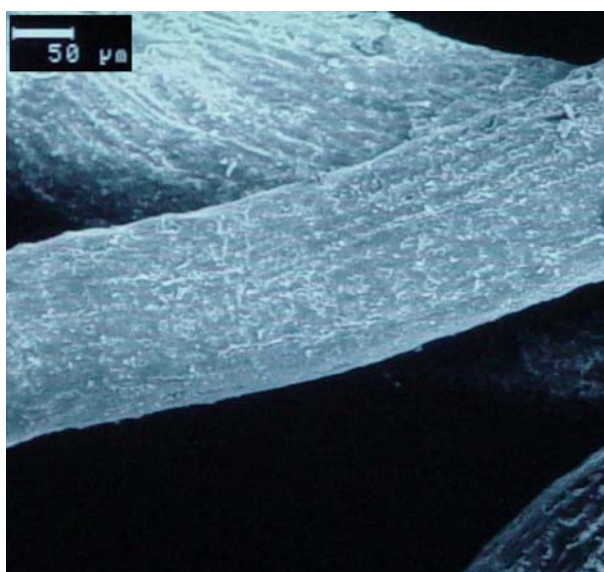
### E.1 MICROFOTOGRAFIAS DE FIBRAS DE COCO VERDE OBTIDAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA



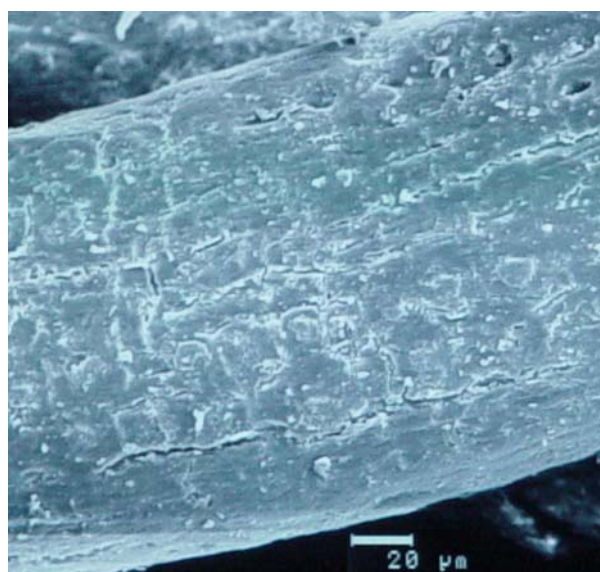
**Figura E.1:** Microfotografia de amostra de fibra bruta selecionada para análise, com aumento de 50 x.



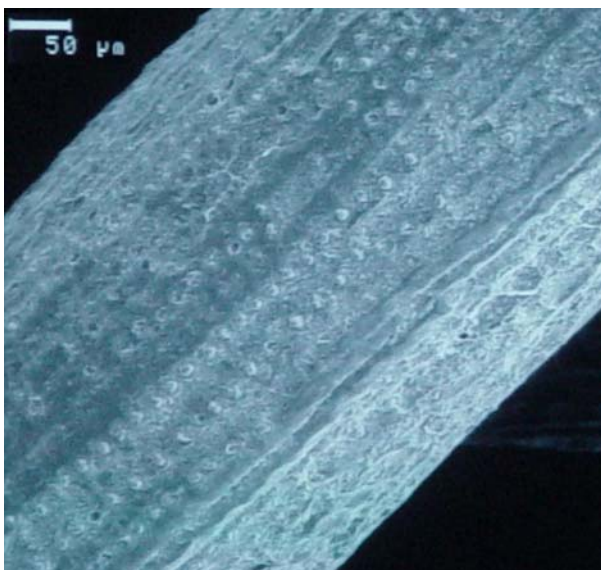
**Figura E.2:** Detalhe da Figura E.1, aumento de 100 x.



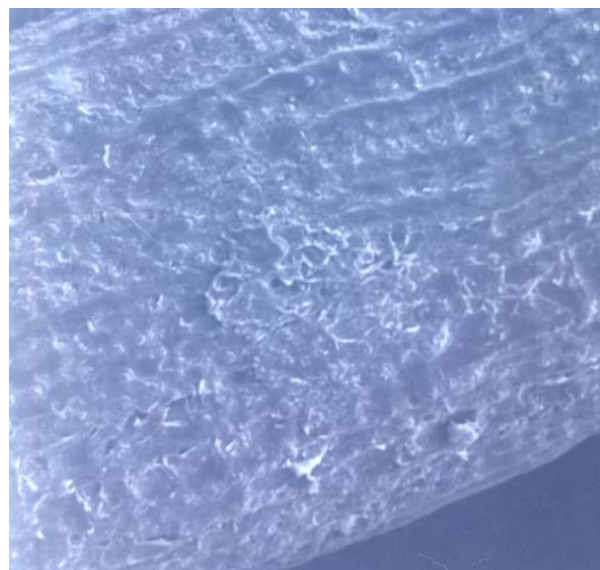
**Figura E.3:** Detalhe da Figura E.1 com um aumento de 200 x.



**Figura E.4:** Detalhe da Figura E.1, aumento de 500 x.



**Figura E.5:** Imagem de outro ponto da amostra de fibra bruta selecionada para análise, com aumento de 200 x.



**Figura E.6:** Imagem de outra amostra de fibra selecionada para análise, com aumento de 200 x.