



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

KÊNIA FRANCO CAVALCANTE

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Rhizomucor miehei* EM ORGANO-
GEL PARA APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA**

FORTALEZA

2014

KÊNIA FRANCO CAVALCANTE

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Rhizomucor miehei* EM ORGANO-GEL
PARA APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano.
Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

-
- C364e Cavalcante, Kênia Franco.
Estudo da imobilização de Lípase de *Rhizomucor miehei* em organo-gel para aplicação em síntese orgânica / Kênia Franco Cavalcante. – 2014.
81 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
Orientação: Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano.
Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
1. Engenharia Química. 2. Lípase. 3. Alginato. 4. Quitosana. I. Título.

KÊNIA FRANCO CAVALCANTE

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Rhizomucor miehei* EM ORGANO-GEL
PARA APLICAÇÃO EM SÍNTESE ORGÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

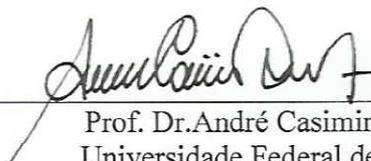
Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 17/02/2014

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano (Orientador)
Universidade Federal de Campina Grande- UFCG



Prof. Dr. André Casimiro de Macedo
Universidade Federal de Ceará- UFC



Prof.^a Dr.^a Maria Cristiane Martins de Souza

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira- UNILAB

*À minha mãe, Hermínia, e minhas irmãs,
Patrícia e Virgínia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força em todos os momentos de dificuldade.

À minha mãe, Hermínia, meu exemplo de vida, e minhas irmãs, Patrícia e Virgínia, pelo carinho, incentivo e amor, estando sempre presentes me apoiando e ajudando em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado, Orlando, pelo carinho, amor, paciência, compreensão e por estar ao meu lado em todas as horas, me apoiando e me motivando a ser uma pessoa melhor sempre.

Ao Prof^o Dr. Wellington Sabino Adriano pela orientação, paciência, pela confiança depositada em mim, pelos comentários de enriquecimento e por todo estímulo no desenvolvimento desse trabalho. À Prof^a Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela co-orientação, por ter dado a oportunidade de fazer parte do Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBio), pela compreensão e contribuições.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química-DEQ/UFC pelas contribuições transmitidas para o aperfeiçoamento dos meus conhecimentos. Em especial ao Prof^o Dr. Ivanildo José da Silva Junior, pelas contribuições e participação da banca de qualificação. A Prof^a Dr. Maria Cristiane Martins de Souza e ao Prof^o Dr André Cassimiro de Azevedo, pelas sugestões e participação na banca.

A todos os amigos do GPBio pela troca de conhecimento, pelos momentos de descontração vividos todos os dias. Em especial, ao Ítalo pela força dada durante as disciplinas e pela disposição em ajudar sempre.

As minhas amigas, pessoas especiais: Camilla, Celina, Kamilly, Mary, Jessyca, Juliana, Ticiane, Gaby e Marcinha. Quero agradecer o carinho, amizade, as palavras de força e colaboração nessa etapa tão importante da minha vida.

Aos funcionários do DEQ/UFC, principalmente, Luís e Jorge (ão) por nos ajudar sempre.

À Universidade Federal do Ceará e o Departamento de Engenharia Química, pela possibilidade de realização desse trabalho e pela obtenção do título de mestre.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“Quando penso que cheguei ao meu limite
descubro que tenho forças para ir além”*

(Ayrton Senna)

RESUMO

Lipases, triacilglicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3, são enzimas que atuam nas ligações ésteres de triacilgliceróis, liberando ácidos orgânicos e glicerol. Podendo, em condições microaquosas, catalisar a reação reversa. Uma limitação da utilização destas enzimas em processos industriais reside na falta de estabilidade operacional e na impossibilidade de sua reutilização na forma livre. O uso do sistema de organo-géis consiste em uma alternativa para a imobilização de enzimas, e para sua utilização na catálise enzimática em meio orgânico. Neste sistema a enzima está localizada no centro micelar (centro aquoso) do organo-gel, eliminando o problemas como de estabilizar a enzima contra inativação por um solvente não-aquoso. O objetivo deste trabalho foi desenvolver derivados de lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em organo-géis à base de polímeros, visando à síntese de ésteres etílicos a partir de reações de esterificação de matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos livres. Os suportes foram obtidos através de diferentes combinações entre os componentes. Utilizaram-se polímeros gelatina (Gel), alginato (Alg) ou quitosana (Qui), fases orgânicas hexano (Hex) ou heptano (Hep) e os tensoativos dodecilsulfato de sódio (SDS) ou brometo de acetilmetilamônio (CTABr). Verificou-se a estabilidade térmica da enzima na sua forma livre, determinando seu tempo de meia-vida. Na primeira etapa, foram produzidos derivados com e sem ativação via glutaraldeído 2% (v/v). A atividade enzimática foi avaliada através hidrólise do p-nitrofenilbutirato (pNPB). Os derivados foram caracterizados quanto: fator de estabilidade a 60°C em relação à enzima livre, eficiência e rendimento de imobilização para assim determinar os melhores biocatalisadores. Dentre os catalisadores obtidos, os melhores apresentaram eficiência de 4,1% e fator de estabilidade 30 vezes (Gel/SDS/Hex), eficiência de 6,0% e fator de estabilidade 1,3 vezes (Alg/SDS/Hep) e eficiência de 1,0% e fator de estabilidade de 2,3 vezes (Qui/SDS/Hep). Os suportes produzidos ativados com glutaraldeído 2% (v/v) apresentaram baixas atividades e eficiências, apesar de obterem valores bons de tempo de meia-vida e fator de estabilidade. Os derivados produzidos com o tensoativo CTABr apresentaram baixas atividades, eficiências, tempo de meia-vida e fator de estabilidade. Na segunda fase, os derivados selecionados foram estudados quanto à carga máxima (50 U.g⁻¹ a 500 U.g⁻¹) de imobilização e eficiência, nas temperaturas de 15°C e 25°C. Avaliou-se a aplicação dos biocatalisadores na reação de esterificação do oleato de etila a partir de ácido oleico e etanol, variando a razão molar ácido/álcool e utilização de agente dessecante (zeólitas). Verificou-se a estabilidade de estocagem sob 10°C por um período de 100 dias. Todos os derivados apresentaram melhores eficiências utilizando carga de 50 U.g⁻¹, apresentando valores de 4,2% e 4,8% (Gel/SDS/Hex), 2,0% e 2,3% (Alg/SDS/Hep) e 0,9% e 1,1% (Qui/SDS/Hep) nas temperaturas de 15°C e 25°C, respectivamente. Nas reações de esterificação os derivados Gel/SDS/Hex e Alg/SDS/Hep obtiveram maiores conversões na razão molar ácido/álcool 1:10, 72,9% e 16,9%, respectivamente. O derivado Qui/SDS/Hep obteve 80,0% de conversão na razão de 1:1. Com utilização de zeólitas o derivado Gel/SDS/Hex aumentou a conversão para 79,0% nas razões 1:1 e 1:5, os derivados Alg/SDS/Hep e Qui/SDS/Hep apresentaram decréscimo nas conversões. Durante os 100 dias de estocagem sob 10°C, os derivados Gel/SDS/Hex e Qui/SDS/Hep mantiveram atividade hidrolítica até 40 dias, tendo um decréscimo ao longo do tempo. O derivado Alg/SDS/Hep obteve um tempo maior de 60 dias, apresentando também um decréscimo.

Palavras chave: lipases. *Rhizomucor miehei*. Imobilização. Organo-géis. Gelatina. Alginato. Quitosana.

ABSTRACT

Lipases, triacylglycerol ester hydrolases EC 3.1.1.3, are enzymes that act on ester bonds of triacylglycerols, releasing organic acids and glycerol. May in microaqueous conditions, catalyze the reverse reaction. A limitation of using these enzymes in industrial processes is the lack of operational stability and the inability to re-use the free form. The use of organo-gels system is an alternative for the immobilization of enzymes and to their use in enzyme catalysis in organic media. In this system the enzyme is located in the micelle center (aqueous center) of the organo-gel, eliminating problems such as stabilizing the enzyme against inactivation by a non-aqueous solvent. The aim of this work was immobilize lipases from *Rhizomucor miehei* into organo - gels based on polymers for future application in ethyl esters synthesis through esterification of raw materials with high free fatty acids content. Supports were obtained using different combinations of components. It was used gelatin polymers (Gel), alginate (Alg) and / or chitosan (Chi), organic phases such as hexane (Hex) and heptane (Hep) and surfactants sodium dodecyl sulfate (SDS) or acetylmetylamonium bromide (CTABr). In the first step, derivatives were produced with and without glutaraldehyde 2% (v/v) activation. Enzymatic activity was measured by hydrolysis of p - nitrophenyl butyrate (PNPb). Biocatalysts were characterized as: stability at 60 ° C and compared to free enzyme, immobilization efficiency and yield factor, thus determining the best biocatalysts. Among the catalysts obtained, (Gel/SDS/Hex) showed the best efficiency of 4.1% , 30 -fold more stable; (Alg/SDS/Hep) with 6.0% efficiency , 1.3 -fold more stable and (Qui/SDS/Hep) with efficiency of 1.0 % , 1.3 -fold more stable than free lipase. Obtained supports activated with glutaraldehyde 2 % (v/v) showed lower activities and efficiencies, in despite of having good values for stability factor. Produced derivatives using surfactant CTABr presented low activity, efficiency and stability factor. In the second step, derivatives were analyzed as maximum load (50 U.g⁻¹ a 500 U.g⁻¹) enzyme immobilization and efficiency at 15 ° C and 25 ° C. It was evaluated biocatalysts application in ethyl oleate achievement in an esterification reaction, using oleic acid and ethanol, by varying molar ratio acid / alcohol with and without using of desiccant agent (zeolite) at 37 ° C and 24 h of reaction. Derivatives were submitted storage stability under 10 ° C studies, for a period of 100 days. All derivatives showed higher efficiencies using an initial enzyme loading of 50 U.g⁻¹, with values of 4.2% and 4.8% (Gel/SDS/Hex), 2.0 % and 2.3 % (Alg/SDS/ Hep) and 0.9 % to 1.1% (Qui/SDS/Hep) at 15 ° C and 25 ° C, respectively. In esterification reactions, Gel/SDS/Hex and Alg/SDS/Hep derivatives showed higher conversions 72.9 % and 16.9 %, respectively, with molar acid / alcohol 1:10. The chemical derivative Qui/SDS/Hep presented 80.0 % conversion with molar acid / alcohol 1:1 ratio. Using zeolites, Gel/SDS/Hex conversion increased to 79.0 % using ratios of 1:1 and 1:5, the Alg/SDS/Hep and Qui/SDS/Hep presented a decreasing in conversions. During 100 days of storage at 10 ° C, Gel/SDS/Hex and Qui/SDS/Hep hydrolytic activity maintained up to 40 days and a decreasing during this period, however, Alg/SDS/ Hep achieved more than 60 days with activity.

Keywords: lipases. *Rhizomucor miehei*. Immobilization. Organo – gels. Gelatin. Alginate. Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reação de hidrólise catalisada por Lipases (SALUM, 2010).....	20
Figura 2- Métodos para imobilização de enzimas (Dalla-Vecchia et al. 2004).	24
Figura 3- Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (DALLA-VECCHIA et al.,2004).	27
Figura 4- Estrutura proposta do organo-gel óleo em água (a) e água em óleo (b) (Rossi et al., 2007).....	28
Figura 5- Estrutura química de alginato (CARNEIRO, 2013).....	30
Figura 6- Estrutura dos biopolímeros (a) quitosana, (b) quitina e (c) celulose (BEZERRA, 2012).....	31
Figura 7- Fluxograma mostrando a preparação e imobilização da enzima em organo-gel à base de gelatina.....	34
Figura 8- Fluxograma mostrando a preparação e ativação do organo-gel à base de gelatina via glutaraldeído 2% (v/v).....	35
Figura 9- Fluxograma do preparo do organo-gel à base de alginato.....	37
Figura 10- Fluxograma mostrando o preparo do organo-gel à base de quitosana.....	38
Figura 11- Fluxograma mostrando o processo de estabilidade térmica para a enzima solúvel e imobilizada.	41
Figura 12- Fluxograma da reação de esterificação do ácido oleico.	44
Figura 13- Estrutura macroscópica dos organo-géis, (a) Gel/SDS/Hex, (b) Alg/SDS/Hep, (c) Qui/SDS/Hep.....	57
Figura 14- Efetividade em função da carga oferecida para o derivado Gelatina/SDS/Hexano. (▲) temperatura de 15°C; (●) temperatura de 25°C.....	59
Figura 15- Efetividade em função da carga oferecida para o derivado Alginato/SDS/Heptano, nas temperaturas de 15°C e 25°C. (▲) temperatura de 15°C; (●) temperatura de 25°C.....	60
Figura 16- Efetividade em função da carga oferecida para o derivado Quitosana/SDS/Heptano, nas temperaturas de 15°C e 25°C. (▲) temperatura de 15°C; (●) temperatura de 25°C.....	61
Figura 17- Perfis de conversão em função da variação da razão molar ácido/álcool na reação de síntese do oleato de etila, carga enzimática com 1 U. g ⁻¹ , 150 rpm e 37°C, tempo de reação 24horas, para os derivados (■) Gelatina/SDS/Hexano,(●) Alginato/SDS/Heptano e (▲) Quitosana/SDS/Heptano.....	63
Figura 18- Perfis de conversão em função da variação da razão molar ácido/álcool na reação de síntese do oleato de etila, com adição de zeólitas, carga enzimática com 1 U. g ⁻¹ , 150 rpm	

e 37°C, tempo de reação 24 horas, para os derivados (■) Gelatina/SDS/Hexano, (●) Alginato/SDS/Heptano e (▲) Quitosana/SDS/Heptano. 65

Figura 19-Estabilidade à estocagem sob refrigeração (10°C) de lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em organo-géis de (A) Alginato/SDS/Heptano, (B) Gelatina/SDS/Hexano e (C) Quitosana/SDS/Heptano. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Classificação dos suportes conforme a composição. Modificado de GUISÁN, 2006.	26
Tabela 2 -Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de gelatina, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e os tensoativos SDS ou CTABr. Sendo (AtDer) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e (t ½) Tempo de meia-vida.	48
Tabela 3 -Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis a base de gelatina, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e os tensoativo SDS ou CTABr, ativados com glutaraldeído 2% (v/v), incubados por 3horas sob agitação e a temperatura ambiente. Carga oferecida 50 U.g-1 de suporte. Sendo (AtDer) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e (t ½) Tempo de meia-vida, (RI) Rendimento de imobilização.....	50
Tabela 4 -Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis a base de alginato de sódio, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e o tensoativo SDS. Sendo (AtDer) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e (t ½) Tempo de meia-vida.	52
Tabela 5 -Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis a base de alginato de sódio, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e o tensoativo SDS, ativados com glutaraldeído 2% (v/v), incubados por 3 horas sob agitação e a temperatura ambiente. Carga oferecida 50 U.g-1 de suporte. Sendo (AtDer) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e (t ½) Tempo de meia-vida, (RI) Rendimento de imobilização.....	54
Tabela 6 -Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de quitosana, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e o tensoativo SDS. Carga oferecida 50 U.g-1 de suporte. Sendo (AtDer) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e (t ½) Tempo de meia-vida.	56
Tabela 7 -Seleção dos melhores biocatalisadores. Sendo (E) Eficiência, (t ½) tempo de meia-vida e (FE) Fator de Estabilidade.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Gel Gelatina

Alg Alginato

Qui Quitosana

SDS Dodecilsulfato de sódio

CTABr Brometo de acetilmetilamônio

HEX Hexano

HEP Heptano

GLU Glutaraldeído

At Atividade enzimática, U. mL⁻¹ ou U.g⁻¹

Ar Atividade relativa, adimensional

t_{1/2} Tempo de meia-vida, minutos

FE Fator de estabilidade térmica

E Eficiência, %

RI Rendimento de imobilização, %

IA índice de acidez, mg KOH.g⁻¹

AG Porcentagem de ácidos graxos, %

X Conversão,%

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1. Enzimas como biocatalisadores.....	17
2.2. Lipases.....	18
2.3 Lipases de <i>Rhizomucor miehei</i>	20
2.4 Imobilização de Enzimas.....	20
2.5 Métodos de Imobilização.....	21
2.6 Suportes para imobilização.....	23
2.7 Organo-géis.....	25
2.8 Gelatina.....	27
2.9 Alginato de sódio.....	27
2.10 Quitosana.....	28
2.11 Esterificação.....	29
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1 Materiais.....	31
3.2 Métodos.....	32
3.2.1 Preparação e imobilização da enzima em organo-gel utilizando gelatina em pó.....	32
3.2.2 Preparação do organo-gel utilizando gelatina seguido de ativação com glutaraldeído 2% (v/v).....	33
3.2.3 Preparação e imobilização da enzima em organo-gel utilizando alginato de sódio.....	33
3.2.4 Preparação do organo-gel utilizando alginato de sódio seguido de ativação com glutaraldeído 2% (v/v).....	35
3.2.5 Preparação e imobilização da enzima em organo-gel utilizando quitosana em pó.....	35
3.2.6 Processo de imobilização da enzima ao suporte.....	36
3.2.7 Determinação de proteínas.....	37
3.2.8 Determinação da atividade hidrolítica da enzima solúvel e imobilizada.....	37
3.2.9 Estabilidade térmica.....	38
3.2.9.1 Parâmetros de inativação térmica.....	39
3.2.10 Determinação dos parâmetros de imobilização.....	41
3.2.11 Ensaios de carga máxima e eficiência.....	41
3.2.12 Avaliação da interação enzima-suporte sob estocagem a 10°C.....	41
3.2.13 Aplicação de lipases imobilizadas na esterificação do ácido oleico.....	42

3.2.14 Índice de acidez e porcentagem de ácidos graxos livres	43
3.2.14.1 Conversão	44
3.2.15 Variação da razão molar ácido/álcool	44
3.2.16 Efeito da remoção de água formada na reação	44
4. Resultados e discussão	45
4.1 Atividade hidrolítica da enzima solúvel	45
4.2 Estabilidade térmica da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> na forma solúvel a 60°C.....	45
4.3 Caracterização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em organo-géis a base de gelatina.....	46
4.4 Caracterização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em organo-géis a base de gelatina ativados com glutaraldeído 2% (v/v)	48
4.5 Caracterização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em organo-géis a base de alginato de sódio	50
4.6 Caracterização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em organo-géis a base de alginato de sódio ativados com glutaraldeído 2% (v/v).....	51
4.7 Caracterização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em organo-géis a base de quitosana	53
4.8 Determinação dos melhores biocatalisadores.....	54
4.9 Ensaio de carga máxima e eficiência	56
4.9.1 Carga máxima dos derivados a temperatura de 15°C e 25°C.....	56
4.10 Aplicação de lipases imobilizadas na esterificação do ácido oleico	60
4.10.1 Esterificação do ácido oleico variando a razão molar ácido/álcool.....	60
4.10.2 Esterificação do ácido oleico variando a razão molar ácido/álcool com utilização de zeólitas	63
4.11 Avaliação da interação enzima-suporte sob estocagem a 10°C	64
5. Conclusões Parciais	66
6. Sugestões para trabalhos futuros	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	77
ANEXO A	77

1. Introdução

A produção mundial anual de óleos e gorduras, cerca de 90 milhões de toneladas, torna essa classe de materiais importante no contexto econômico internacional (GUNSTONE, 1999; GOMES *et al.*, 2008). A maior parte se destina ao setor alimentício, no entanto, é crescente o interesse de obterem-se produtos químicos de maior valor agregado a partir dessas matérias-primas (CASTRO *et al.*, 2004). Apesar de já existirem no mercado algumas preparações enzimáticas bem estabelecidas, a aplicação das enzimas na indústria de óleos e gorduras é crescente, os processos enzimáticos ainda não estão suficientemente difundidos nesse segmento industrial. As enzimas podem ser empregadas tanto para a resolução de problemas industriais como também para a formação de produtos secundários indesejáveis, na produção de novos tipos de óleos e gorduras. (AGUIAR *et al.*, 2010).

A tecnologia de produção de ácidos graxos com enzimas tem a vantagem de poder ser realizada em condições brandas de temperaturas e pressão, o que reduz o consumo de energia e de produtos químicos agressivos ao meio ambiente (AGUIAR *et al.*, 2010). Uma grande limitação da utilização de enzimas em processos industriais está na falta de estabilidade operacional das mesmas e na impossibilidade de sua reutilização na forma livre e sua principal desvantagem é a purificação para posterior aplicação, além da contaminação do produto desejado devido à solubilidade das enzimas em água (MENDES *et al.*, 2011 a.). A utilização de enzimas como matéria-prima não reciclável tem inviabilizado seu uso industrialmente, pois enzimas possuem um alto custo. Visando contornar esse problema e promover a reutilização destas enzimas têm sido realizados estudos sobre imobilização de enzimas. (ADRIANO, 2008; VIEIRA, 2009; MENDES *et al.*, 2011 a.; BEZERRA, 2012).

Imobilização é definida como o confinamento da enzima em um suporte sólido, para reutilização posterior do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso (GUISÁN, 2006). Este método promove uma série de vantagens como reutilização do biocatalisador, utilização em processos químicos, redução do volume reacional, maior controle operacional, maior estabilidade térmica e pH e maior facilidade de separação do produto final, sem contaminação pelo catalisador (ADRIANO, 2008; BEZERRA, 2012).

A seleção do melhor método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade do imobilizado, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada. Diferentes protocolos têm sido empregados na imobilização e estabilização de enzimas como adsorção hidrofóbica, adsorção iônica, encapsulação em matrizes orgânicas,

1. Introdução.....Cavalcante, K.F.

inorgânicas e em matrizes híbridas e por ligação covalente unipontual e multipontual em suportes previamente ativadas (MENDES *et al.*, 2013).

Diversas enzimas, como lipases, proteases, amilases, celulasas, xilanases são utilizadas industrialmente. Dentre estas se destacam as lipases, devido a gama de reações catalisadas (esterificação, transesterificação, aminólise), à alta estabilidade em sistemas orgânicos e condições brandas de reação (MUSSATTO *et al.*, 2007).

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que atuam catalisando a hidrólise de lipídeos para liberar ácidos orgânicos e glicerol (MENDES *et al.*, 2013). As lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos. Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para efetuar reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados (OLIVEIRA *et al.*, 2000, YAHYA *et al.*, 1998, PAIVA *et al.*, 1997). Este fenômeno é devido à sua capacidade de utilização em uma ampla variedade de substratos, à sua estabilidade na presença de solventes orgânicos e à sua quimio, regio e enantiosseletividade (MENDES *et al.*, 2013).

A aplicação de lipases em reações de esterificação é promissora na produção de ésteres de interesse comercial na área de solventes, diluentes, plastificantes, surfactantes, indústria farmacêutica, herbicidas e pesticidas (CARVALHO, 2011; TREICHEL *et al.*, 2010; JOSEPH *et al.*, 2008). Estudos têm sido intensificados devido à estabilidade destas enzimas em diversos solventes orgânicos, abrindo inúmeras possibilidades no campo da síntese química, onde as diferentes seletividades de lipases de varias fontes aliada às condições suaves de temperatura e pressão em que atuam, apresentam uma enorme vantagem em relação aos catalisadores convencionais (VOLPATO, 2009). Em reações de transesterificação, catalisadores enzimáticos, quando comparados com os químicos, simplificam o procedimento para recuperação de ésteres de ácidos graxos e dos produtos gerados eliminando a geração de resíduos (YANG *et al.*, 2007).

Estudos demonstraram que enzimas podem ser imobilizadas em organo-géis. O uso do sistema de organo-géis consiste, portanto em uma nova alternativa para a imobilização de enzimas, e para sua utilização na catálise enzimática em meio orgânico. O organo-gel é obtido pela mistura de uma solução de polímero em água, solvente orgânico e tensoativo. Neste sistema a enzima está localizada no centro micelar (centro aquoso) do organo-gel, eliminando os problemas como de estabilização da enzima contra inativação por um solvente não-aquoso.

1. Introdução.....Cavalcante, K.F.

O sistema final é um gel homogêneo, cuja consistência e propriedades físicas dependem da concentração relativa do polímero e água (JESUS *et al.*, 1997).

Recentemente tem-se investigado o potencial catalítico de lipases imobilizadas em organo-géis, para a formação de ésteres, resolução de álcoois secundários racêmicos, dentre outros, e estudado o comportamento durante as reações de esterificação neste novo sistema. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo, além de não requererem cofatores (JESUS *et al.*, 1997).

Em função destas propriedades, tem sido estudado o aproveitamento dessas enzimas em variados compôs de aplicação (VILLENEUVE, 2007), como na formulação de detergentes para limpeza doméstica, produção de fármacos, na indústria alimentícia conferindo aromas e na produção de biodiesel. Estudos mostram que as lipases representam cerca de 35% das enzimas utilizadas no desenvolvimento de processos bioquímicos (PAQUES e MACEDO, 2006).

Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo desenvolver derivados de lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em organo-géis visando à síntese de ésteres etílicos a partir de reações de esterificação de matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos livres.

Dentro deste aspecto do objetivo geral, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- Preparação e caracterização de biocatalisadores produzidos a partir da imobilização de lipases de *Rhizomucor miehei* em organo-géis à base de polímeros;
- Avaliação do desempenho dos biocatalisadores obtidos quanto à atividade dos derivados, eficiência e estabilidade térmica;
- Comparar a enzima solúvel com a imobilizada, a partir dos ensaios de estabilidade térmica, determinando suas eficiências, tempo de meia-vida e fator de estabilidade;
- Avaliação dos melhores derivados obtidos quanto à carga máxima de enzima imobilizada por grama de suporte, nas temperaturas de 15°C e 25°C.
- Avaliação da aplicação dos melhores derivados obtidos em reações de esterificação do ácido oleico, variando a concentração molar ácido/álcool, verificando prováveis efeitos inibitórios causados pelos reagentes.

2. Revisão de Literatura

2.1. Enzimas como biocatalisadores

As enzimas são especializadas na catálise de reações biológicas, possuem uma grande especificidade e poder catalítico, que são superiores aos dos catalisadores inorgânicos e orgânicos. Atuam diminuindo a energia de ativação necessária para que se atinja um estado de transição e ocorra reação química, acarretando o aumento da velocidade de uma reação. A atividade catalítica depende da integridade da conformação nativa da enzima, pois, se a enzima for desnaturada ou dissociada em suas subunidades, a atividade catalítica é perdida, portanto, as estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias protéicas são essenciais para a sua atividade catalítica (CARNEIRO, 2013).

As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial podem ser associados aos tipos de catalisadores químicos utilizados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuem baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista, ou produtos contaminados, que requerem uma etapa posterior de purificação (MARCHETTI *et al.*, 2007, RANGANATHAN *et al.*, 2008, ANTCZAK *et al.*, 2009).

As enzimas atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão atingindo velocidades de reação bastante superior ao catalisadores químicos convencionais. (KRAJEWSKA, 2004; HASAN, *et al.*, 2006). Este comportamento das enzimas permite uma redução no custo final do processo, com a redução no consumo de energia e formação de subprodutos indesejáveis, devido à sua elevada especificidade, resultando em um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis e redução da quantidade de resíduos gerados ao meio ambiente. (CASTRO *et al.*, 2004, MENDES, 2009, VASCONCELLOS, 2010).

Em sua forma solúvel, muitas enzimas não são suficientemente estáveis nas condições de reações desejáveis, devido a fatores como agitação mecânica, presença de solventes, altas temperaturas, pH, necessidade de cofatores e sua inibição por altas concentrações de substrato e produtos, provocando a perda de sua atividade e especificidade. Atualmente, o principal objetivo da tecnologia enzimática é de superar inconvenientes que impeçam a aplicação de enzimas em processos industriais. Este objetivo pode ser alcançado através da diminuição dos custos de produção, do melhoramento genético para aumentar a expressão da enzima de interesse, da imobilização e estabilização de enzimas, dentre outros (VOLPATO, 2009).

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação durante a década de 60, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004). Desde então, os processos enzimáticos tem sido aplicados em diversos setores, como, por exemplo, construção de biossensores, terapia enzimática, síntese enzimática de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústria tradicionais como curtumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos e dentre outras aplicações (ADRIANO, 2008).

2.2. Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) fazem parte de um grupo especial de enzimas hidrolíticas que catalisam a quebra de ligações éster de triacilgliceróis de cadeia longa, liberando os ácidos graxos e glicerol (CASTRO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2012).

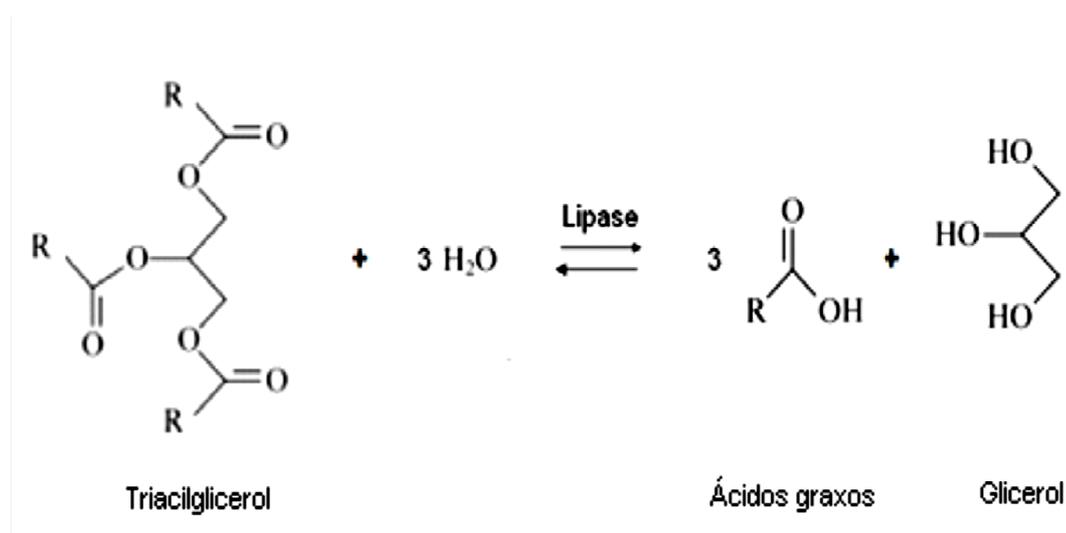


Figura 1- Reação de hidrólise catalisada por Lipases (SALUM, 2010).

Uma característica das lipases é o fato de serem mais ativas com os substratos insolúveis em água do que com solúveis (SAXENA *et al.*, 2003). Elas são únicas em catalisar reações na interface água-lipídeo e revertê-las em meio não-aquoso e sua conformação muda em contato com um substrato insolúvel em água (SAXENA *et al.*, 2003; TREVISAN, 2004, VASCONCELLOS, 2010).

Reações de esterificação são comercialmente importantes, com produções que pode chegar a milhões de toneladas por ano. Ésteres servem tanto como precursores, como aditivos para uma variedade de perfumes e sabores, fármacos, agroquímicos, plastificantes e

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

polímeros, e também como solventes. Muitos ésteres são produzidos por métodos tradicionais que incluem síntese química e extração de fonte natural. Ésteres extraídos de plantas são mais escassos ou caros para uso comercial, enquanto aqueles sintetizados por métodos químicos usam ácidos homogêneos como catalisadores, os quais podem trazer vários problemas como corrosão de equipamentos, perigo no manuseio de ácidos corrosivos, não reutilização, necessidade de neutralização da massa resultante da reação gerando grandes quantidades de sal dissolvido, perda de conversão, rendimento e seletividade, bem como poluição e alto custo de manufatura (YADAV e TRIVEDI, 2003).

Reações de esterificação catalisada por lipase estão entre os processos químicos e bioquímicos de maior relevância industrial. Esterificação catalisada por enzima adquiriu uma atenção crescente em muitas aplicações, devido à importância dos produtos obtidos. Mais especificamente, as reações de esterificação catalisada por lipase atraiu interesse de pesquisa durante a última década, devido a um aumento do uso de ésteres orgânicos em biotecnologia e na indústria química (STERGIOU *et al.*, 2013).

Lipases tem sido frequentemente utilizada como biocatalisadores industriais na modificação de gorduras na indústria de cosméticos e alimentos, em reações de esterificação e transesterificação. Além destas aplicações, estas enzimas vêm sendo empregadas na resolução de misturas racêmicas de álcoois, ésteres e ácidos quirais (OLIVEIRA, 2012). Estes ésteres são utilizados em solventes, essências, herbicidas e na produção do biodiesel (CARNEIRO, 2013).

As lipases não só atuam na hidrólise de lipídeos, como também tem a capacidade de catalisarem a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação ésteres a partir de álcool e ácidos carboxílicos. Estes processos podem ser combinados para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados (CASTRO *et al.*, 2004, CARNEIRO, 2013).

Lipases são produzidas por muitos microrganismos (fungos e bactérias) e eucariontes superiores (vegetais e animais) (TREVISAN, 2004). Do ponto de vista econômico e industrial, a maioria das lipases comerciais é de origem microbiana, obtidas por meio de fermentação, são preferíveis com relação às de fontes de animais e de plantas, por sua relativa facilidade e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las (BARON, 2008).

Microrganismos produtores de lipases têm sido encontrados nos mais diversos habitats, como resíduos industriais, indústrias de óleos vegetais, laticínios, solo contaminado com óleo, semente de oleaginosas, alimentos em decomposição, pilhas de compostagem (TREVISAN, 2004; VASCONCELLOS, 2010).

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

Entre as lipases, as de *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas glumae*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Chromobacterium viscosum*, lipase pancreática de cavalo, pancreática humana e pancreática bovina, têm sua estrutura determinada. A massa molecular destas enzimas varia de 20 a 75 kDa. Seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 e 7,6, sendo a maioria com pI entre 4 e 5 (DALLA- VECCHIA *et al.*, 2004). São usualmente estáveis em solução aquosa neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria atividade ótima na faixa de temperatura entre 30°C e 40 °C (MENDES, 2009).

2.3 Lipases de *Rhizomucor miehei*

Lipases de *Rhizomucor miehei* são enzimas extracelulares de origem fúngica, constituídas de 269 aminoácidos, com massa molecular de 29 kDa e um ponto isoelétrico de 3,8 (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; OLIVEIRA, 2012).

Seus sítios catalíticos são formados pelos resíduos dos aminoácidos serina 144, histidina 257 e aspartato 203 (BRADY *et al.*, 1990). Os resíduos serina 82 e leucina 145 constituem a “cavidade do oxianion” (NORIN *et al.*, 1994). A região da tampa hidrofóbica, chamada de lid, é constituída de resíduos de aminoácidos que vão desde a posição 85 até a 91 (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991).

Atualmente, as lipases de *Rhizomucor miehei* são comercializadas na forma solúvel (Palatase 200L) ou na forma imobilizada (Lipozyme RM IM), por fabricantes como a Sigma e a Novozymes (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

2.4 Imobilização de Enzimas

Enzima imobilizada é definida como a enzima fisicamente confinada ou localizada em certa região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, a qual pode ser usada repetida e continuamente (CHIBATA, 1978).

As enzimas, como por exemplo, as lipases, são muito empregadas industrialmente. Entretanto, a aplicação de enzimas em solventes orgânicos tem sido dificultada, devido à baixa atividade catalítica comparada à obtida em meio aquoso e pelo seu alto custo de produção. Por outro lado, técnicas como a imobilização em suportes sólidos têm provado

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

serem úteis para aumentar a atividade enzimática em ambientes microaquosos, além de possibilitar a reutilização da enzima, com isso contribuindo para redução de seus custos de produção, tornando vantajoso o uso de enzimas em processos industriais (SALUM, 2010). O uso de lipase imobilizada em processos de esterificação leva a altos rendimentos do éster sob suaves condições de operação, dispensando etapas posteriores de purificação (GARCIA *et al.*, 2000 a, b).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos aumenta a resistência mecânica dos catalisadores, como a sua estabilidade térmica e permite uma fácil separação do catalisador imobilizado do reagente e do produto. No entanto, a imobilização deve ser irreversível e estável sob as condições de reação adversas. Ao mesmo tempo, alta atividade, boa acessibilidade aos substratos e tempos de resposta curtos deve ser mantidos, enquanto a lixiviação da biomolécula tem de ser evitada (MICHAUX, 2010).

As vantagens obtidas pelo processo de imobilização são o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas, permitindo sua reutilização sem perdas significativas da sua atividade catalítica. As principais desvantagens deste processo são alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização, interação suporte enzima e a redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusionais, de microambiente e estéricos-conformacionais. (ADRIANO, 2008).

A possibilidade de reutilização ou uso contínuo, insolubilidade e estabilidade são características desejadas comercialmente, oferecidas por uma enzima quando esta se encontra imobilizada em suporte inerte adequado. (ADRIANO, 2008). Para alcançar bons resultados em um processo de imobilização enzimática é importante conhecer a enzima utilizada, suporte para imobilização, agente ativador e metodologia de imobilização (BEZERRA, 2012).

As propriedades da enzima tais como massa molecular, quantidade e distribuição das regiões hidrofóbicas na superfície da enzima, número de resíduos da enzima que podem reagir com o suporte e protocolo de ativação utilizado também podem influenciar na quantidade de enzima imobilizada ao suporte (MENDES, 2009). É importante em operações industriais usar suportes com elevada quantidade de enzima imobilizada, conduzindo a uma menor massa de catalisador gasto por volume do reator, permitindo uma alta estabilidade operacional ao catalisador e, conseqüentemente, aumentando sua reusabilidade (ADRIANO *et al.*, 2005).

2.5 Métodos de Imobilização

A imobilização pode ocorrer através da encapsulação ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica. A Figura 2 mostra a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

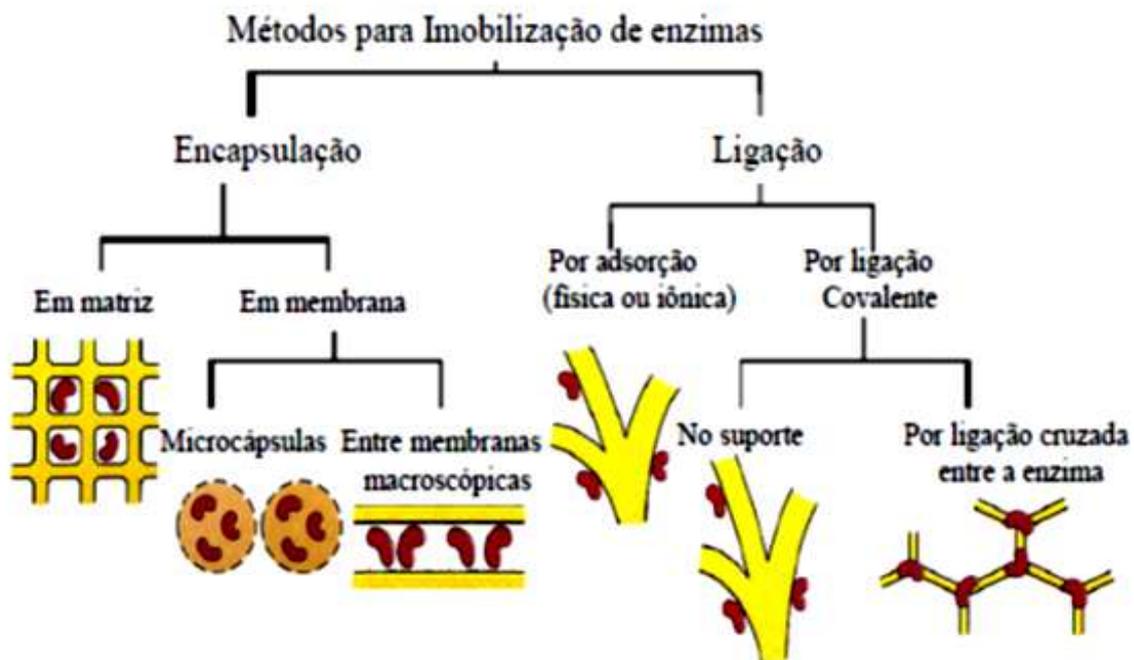


Figura 2- Métodos para imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA *et al.* 2004).

A imobilização no interior do suporte pode ser dividida em separação por membranas ou entrelaçadas em polímero ou matriz. No método de separação por membrana, a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável, podendo ser realizado pelo mecanismo de microencapsulamento, onde a enzima é imobilizada no interior de esferas não rígidas, cujo envoltório é constituído por um polímero geleiforme e semipermeável ou por membranas fibrosas semipermeáveis, que consiste no confinamento da enzima numa dada região da solução através de uma membrana semipermeável. No método de confinamento em matriz, a enzima é aprisionada entre as malhas de um polímero geleiforme (BARON, 2008).

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

O encapsulamento de enzimas tem uma grande influência no desenvolvimento de biocatálise, biossensores e biocombustível. Os materiais encapsulados, como por exemplo, a sílica, titânia, alumina e zircônio, são geralmente quimicamente inertes, hidrofílicos e termicamente estáveis, o que pode evitar a desnaturação das enzimas. Neste método não é necessária uma ligação covalente com o grupo amino ou carboxílico das enzimas, por isso raramente muda a conformação espacial das enzimas. Além disso, o processo de encapsulamento é normalmente realizado a temperatura ambiente, o que favorece a preservação da atividade destas enzimas (LIU *et al.*, 2013). A enzima é delimitada por uma matriz polimérica, que protege a partir de agregação e desnaturação por desdobramento. Portanto, não é necessário anexar as moléculas de enzima para as paredes de gel. Estas interações podem afetar negativamente o desempenho das enzimas (CUMANA *et al.*, 2013).

A imobilização sobre um suporte pode ser dividida em imobilização por ligação covalente, como o próprio nome sugere, a enzima é ligada ao suporte mediante ligações químicas covalentes ou através de ligações cruzadas, que são normalmente estabelecidas entre os aminogrupos primários e os anéis fenólicos dos aminoácidos constituintes da enzima, com os grupos reativos do suporte (BARON, 2008); por adsorção física ou iônica que consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, força de Van der Waals, ligação de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima, quando comparado aos outros tipos de imobilização e, por isso, geralmente não promove a perda da atividade catalítica (BARON, 2008, BEZERRA, 2012).

Dentre todos os métodos, a adsorção ainda é o mais utilizado para imobilização de lipases, devido a grande porção hidrofóbica destas enzimas, à facilidade e simplicidade na metodologia, e por ser economicamente mais barato e menos agressivo em relação à atividade enzimática. No caso de lipases, verificou-se que o processo de imobilização por adsorção e por interação hidrofóbica pode propiciar uma ativação da enzima e um aumento de sua estabilidade frente à temperatura (SECUNDO *et al.*, 2008, KNEZEVIC *et al.*, 2002, PAIVA *et al.*, 2000, BARON, 2008).

2.6 Suportes para imobilização

As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo e outras. Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos e também podem ser classificados conforme sua morfologia como materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel, como mostra a Tabela 2 (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Tabela 1-Classificação dos suportes conforme a composição. Modificado de GUIÁN, 2006.

Suportes orgânicos	Polímeros naturais	Polissacarídeos: Agarose, quitosana, alginato e outros. Proteínas: Colágeno, albumina. Carbonos
	Polímeros sintéticos	Poliestireno, poliacrilato, poliamidas.
Suportes inorgânicos	Minerais naturais	Areia, betonita, sílica.
	Materiais processados	Vidro (não poroso e poro controlado), metais, óxidos.

Suportes inorgânicos são bastante adequados para o uso industrial, devido as suas propriedades físicas, além de vantagens como elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, microbiológica e a solventes orgânicos. No entanto, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas são obtidas com matrizes orgânicas, provavelmente, devido a grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser adicionados a estes suportes (ADRIANO, 2008, VIEIRA, 2009, BEZERRA, 2012).

Os suportes porosos que possuem área superficial muito maior que a enzima são os mais adequados, pois permitem interações enzima-superfície, ideais para estabelecer ligações em vários pontos com a enzima, sem impedimento estérico (ADRIANO, 2008). Os materiais não porosos eliminam a resistência de massa interna, porém apresentam baixa área superficial disponível para a ligação da enzima. Visando a redução deste problema, podem ser utilizadas partículas finas ou fibras, porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam partículas muito finas, como por exemplo, a alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos (ADRIANO, 2008, MENDES, 2009, BEZERRA, 2012).

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

O suporte para imobilização de enzimas deve apresentar numerosos grupos de fácil ativação para participar de múltiplas ligações entre os grupos reacionais. Para se conseguir uma imobilização com múltiplas ligações, necessita-se uma elevada densidade de grupos funcionais no suporte e uma congruência geométrica entre o suporte e a enzima. Esta imobilização multipontual da enzima ao suporte aumenta a estabilidade enzimática (ADRIANO, 2008).

2.7 Organo-géis

O uso do sistema de organo-gel consiste em alternativa para a imobilização de enzimas, para sua utilização na catálise enzimática em meio orgânico. Neste sistema a enzima encontra-se confinada no centro micelar, na porção aquosa do organo-gel, como mostra a Figura 3 (JESUS *et al.*, 1997).

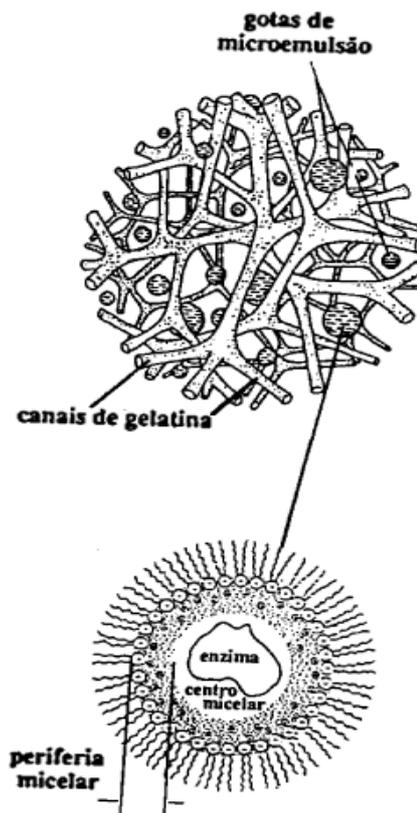


Figura 3-Modelo proposto para a estrutura do organo-gel (DALLA-VECCHIA *et al.*,2004).

O sistema organo-gel consiste em uma dispersão isotrópica e opticamente transparente de óleo em água (O/W) ou de água em óleo (W/O), conforme a Figura 4, onde o óleo é um solvente orgânico (hexano, heptano). Os organo-géis são sistemas organizados, por isso, fáceis de serem preparados. São obtidos através do resfriamento de uma solução previamente aquecida a 55°C, de um tensoativo em solvente orgânico (hexano, heptano) e uma solução aquosa de um polímero. O sistema final é um gel homogêneo, cuja consistência e propriedades físicas dependem da concentração do polímero e água. Portanto, as gotas aquosas do organo-gel encontram-se em equilíbrio com uma estrutura de polímero e da água, rodeada por um tensoativo (JESUS *et al.*, 1997).

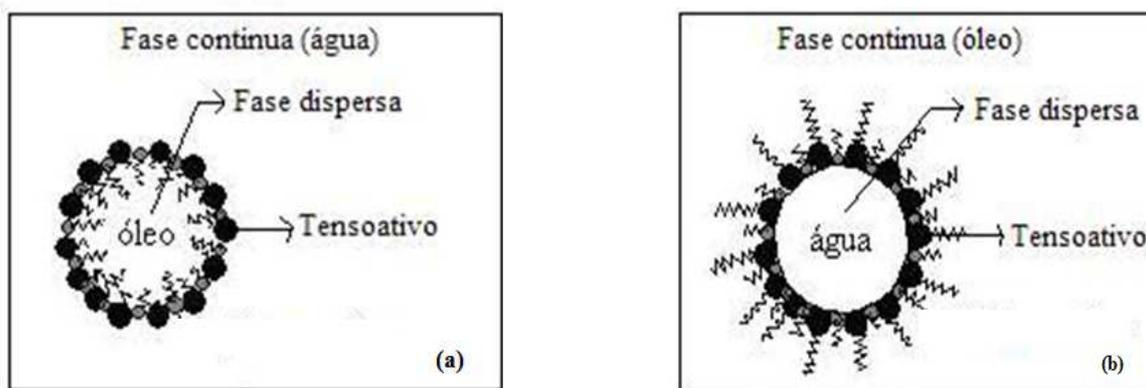


Figura 4-Estrutura proposta do organo-gel óleo em água (a) e água em óleo (b) (ROSSI *et al.*, 2007).

Estes organo-géis são produzidos a partir da adição de agentes geleificantes, como por exemplo, a gelatina, derivados de celulose ou ágar, alginato de sódio, quitosana, obtendo-se uma matriz adequada para a imobilização de enzimas. O termo "gel" é utilizada para caracterizar os sistemas sólidos ou semi-sólidos consistindo em pelo menos dois componentes. São sistemas condensados composta por um líquido, enquanto que no seu interior ou outro solvente orgânico, moléculas podem ser transferidas (por exemplo, por meio de difusão). Quando o líquido é água, eles são chamados hidrogéis e quando o líquido é óleo são chamados organo-géis (ZOUMPANIOTI *et al.*, 2010).

Lipases imobilizadas em organo-géis mantem sua atividade catalítica e estabilidade para longos intervalos de tempo. Além disso, na maioria das condições, a matriz de gel retém

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

totalmente o surfactante, polímero, água e enzima, o que permite a difusão de substratos não polares ou produtos entre a fase não polar e os *pellets* de gel (REES *et al.*, 1991).

Organo-géis contendo a enzima oferecem muitas vantagens, tais como a capacidade de dispersar o biocatalisador a um nível molecular e incorporar cofator enzimático (FADNAVIS e KOTESHWAR, 1999). No entanto, apresentam inconvenientes, tais como a sua baixa estabilidade térmica e mecânica e a sua baixa resistência em ambiente hidrofílico, o que leva à utilização de outros componentes de biopolímeros como os derivados de celulose (DELIMITSOU *et al.*, 2002, ZOUMPANIOTI *et al.*, 2010).

2.8 Gelatina

A gelatina é um biopolímero extraído por hidrólise do colágeno, proteína insolúvel, encontrada na pele e cartilagem de bovinos, suínos e peixes, contendo uma série de fragmentos proteicos, que quando absorvidas pelo organismo são parcialmente digeridas fornecendo aminoácidos. São fundamentais para manutenção dos ossos e reconstrução ou regeneração de algumas articulações (CHEN *et al.*, 2005). A gelatina contém um número grande de glicina (quase 1 em 3 resíduos), prolina e resíduos de 4- hidroxiprolina (ADRIANO, 2008).

A superposição da tripla hélice produz as fibras do colágeno, que são estabilizadas por meio de ligações cruzadas e formam uma estrutura de rede tridimensional. Esta estrutura é responsável pela insolubilidade do colágeno, onde através de uma hidrólise parcial bastante forte é transformado em colágeno solúvel, resultando ou em gelatina, ou em colágeno hidrolisado (SOUZA, 2013).

Existem dois tipos deste biopolímeros: tipo A e tipo B, a gelatina tipo A é derivada de um precursor ácido, e a gelatina do tipo B é derivado de um precursor alcalino (SOUZA, 2013; ADRIANO, 2008).

2.9 Alginato de sódio

O alginato de sódio pode ser encontrado na forma de pó fino ou grosso quase inodoro e insípido, de cor branco-amarelada, pode ser extraído de algas marrons. É bastante hidrossolúvel, formando uma solução coloidal viscosa. Na indústria alimentícia, é usado para

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

cosméticos em suspensão, como goma e como ligante e espessante em comprimidos. Os sais de vários cátions polivalentes e o ácido algínico têm propriedades úteis para formação de géis. Tem aplicação na geleificação para vários fins como imobilização enzimática, formação de membranas e encapsulação de drogas (ADRIANO, 2008; CARNEIRO, 2013).

O alginato pertence à família de copolímeros binários, composto por ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), de larga variação na composição e estrutura sequencial (Figura 5). Esses resíduos são unidos por ligações 1 \rightarrow 4 e podem variar largamente em sua composição e sequência dependendo da origem da alga. (TURBIANO, 2007; ADRIANO, 2008; CARNEIRO, 2013).

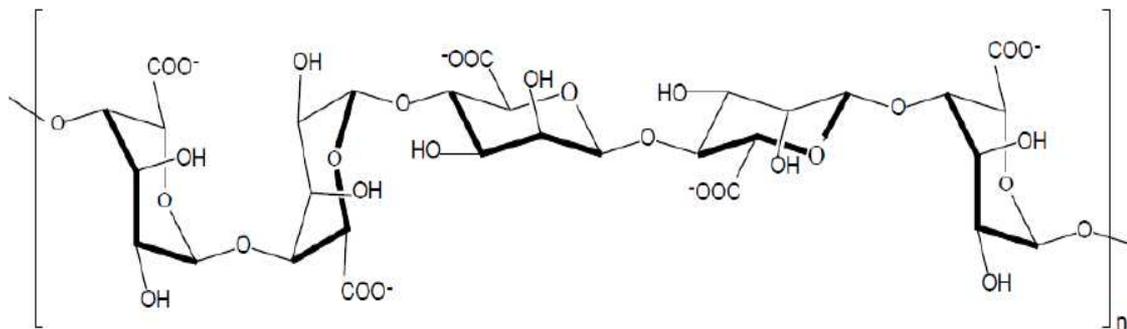


Figura 5-Estrutura química de alginato (CARNEIRO, 2013).

2.10 Quitosana

A quitosana é um oligossacarídeo derivado da quitina, poli-N-acetilglicosamina, polímero mais abundante na natureza depois da celulose, diferenciando-se apenas nos grupos funcionais, como mostra a Figura 6 (KRAJEWSKA, 2004), o qual pode ser facilmente obtido de fontes naturais como o rejeito de indústrias pesqueiras, principalmente nas carapaças dos crustáceos, notadamente camarão, lagosta e caranguejo, constituindo cerca de 30% do exoesqueleto destes últimos (CARNEIRO, 2013; SANTOS, 2011).

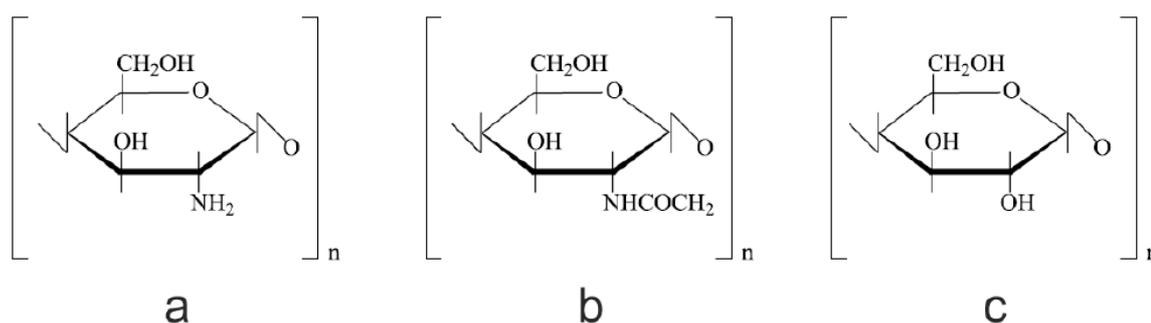


Figura 6-Estrutura dos biopolímeros (a) quitosana, (b) quitina e (c) celulose (BEZERRA, 2012).

Dentre os diferentes suportes usados na imobilização de enzimas, quitosana tem sido amplamente empregada devido seu baixo custo, atóxico e possuidor de grupos amino primários funcionais em potencial, disponibilidade em grandes quantidades, e possibilidade de aplicação em diversos processos industriais (SANTOS, 2011). Estes polímeros naturais apresentam vantagens em relação aos sintéticos por terem menos limitações quanto à biodegradabilidade e biocompatibilidade, porém podem exibir uma limitação em suas reatividades e processamentos (ADRIANO, 2008).

Devido a sua alta percentagem de nitrogênio (6,89%) comparado à celulose sintética substituída (1,25%), a quitosana é um potente agente geleificante, propriedade que é responsável por muitas aplicações desta em diversos setores de síntese e produção industrial, ou seja, suas propriedades atóxicas e sua fácil formação de géis são de grande interesse industrial (BERGER *et al.*, 2004).

O emprego de quitosana como suporte em imobilização de enzimas torna-se uma opção atrativa por apresentar uma maior afinidade por proteínas, por apresentar um maior número de grupos aminos livres reativos em sua molécula (HIRANO, 1996, BEZERRA, 2012).

2.11 Esterificação

Reações de esterificação são empregadas na produção de compostos de alto valor agregado na indústria de fármacos e polímeros, na síntese de agroquímicos e na produção de

2. Revisão de Literatura.....Cavalcante, K.F.

combustíveis, como o biodiesel e surfactantes biodegradáveis. Os ésteres conferem sabor e aroma característico de frutas, são atualmente os mais empregados como agentes flavorizantes e aromatizantes na indústria de alimentos, de cosméticos e na indústria farmacêutica (MARTINS *et al.*, 2011 ; MAHAPATRA *et al.*,2009).

Nas últimas décadas, uma crescente demanda por produtos obtidos de fontes naturais desencadeou um avanço nas pesquisas que visam substituir os processos químicos tradicionais onerosos e ambientalmente inseguros por rotas biotecnológicas (enzimáticas ou fermentativas) economicamente viáveis para a obtenção de alguns compostos, incluindo ésteres, que podem ser utilizados por diversos segmentos do setor industrial (ABBAS *et al.*, 2002; SERRA *et al.*, 2005; DUBAL *et al.*, 2008).

Estas reações catalisadas por lipases em meios não convencionais como solvente orgânico, líquidos iônicos ou fluidos supercríticos, tem sido apontados como uma alternativa promissora para a produção de alguns ésteres de interesse comercial em substituição aos processos químicos convencionais (RADZI, 2011; BEN SALAH *et al.* 2007).

As lipases catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis, agindo apenas na interface óleo/água, podendo catalisar também reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos. A vantagem de se utilizar processo enzimático é devido ao bom rendimento obtido, maior seletividade, inexistência de rejeito aquoso alcalino e menor produção de outros contaminantes (ARAÚJO, 2009).

A reação de esterificação é a reação inversa da hidrólise, ocorrendo entre álcoois e ácidos graxos livres. A relação entre as velocidades da reação direta (hidrólise) e da reação inversa (esterificação) é normalmente controlada pelo conteúdo de água do meio de reação (CARVALHO *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2004; ARAÚJO, 2009).

Estudos recentes revelaram que, em reações de esterificação, a atividade das lipases está relacionada com os efeitos do microambiente. Sua atividade é atribuída à inacessibilidade do substrato, em vez que a enzima pode sofrer desnaturação, devido à composição interfacial. Fatores como a ocorrência de água, que é um forte nucleófilo, não favorece a esterificação. Além disso, os efeitos do ácido orgânico e o comprimento da cadeia do substrato são significativos em reações de esterificação catalisadas por lipases. A temperatura e o pH também são fatores que geralmente afetam a esterificação. Cada enzima possui seu valor ótimo de atuação. Qualquer fator, que afeta ligação do substrato, influencia a taxa de esterificação (STERGIOU *et al.*, 2013).

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais e a descrição das metodologias utilizadas durante o desenvolvimento deste trabalho. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Grupo de Pesquisa e Processos Biotecnológicos (GPBio) no Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.1 Materiais

Como suportes para imobilização utilizou-se gelatina em pó incolor sem sabor da marca Oetker®, alginato de sódio P.A (Dinâmica, SP) e quitosana em pó (grau de desacetilação de 85, 9%) adquirido junto a POLYMAR IND LTDA.

Para a preparação dos suportes, utilizaram-se os seguintes reagentes: hexano P.A (Synth, SP), N- heptano P.A (Vetec, SP), dodecilsulfato de sódio (SDS), brometo de acetilmetilamônio (CTABR) (Sigma Chemical Company, St Loius, EUA), ácido acético glacial 95%, álcool etílico P.A, dentre outros reagentes todos de grau analítico e de diversas marcas.

Foi utilizada Lipase (EC 3.1.1.3) de *Rhizomucor miehei*, Palatase® 20,000 L, sua atividade foi de $250,5 \pm 1,9 U_{\text{PNPB}}.\text{mL}^{-1}$ de extrato enzimático ($6,87 \pm 0,011$ mg de Proteína. mL^{-1} de extrato enzimático), da marca Sigma Chemical Company (St Louis, EUA).

Como agente ativante utilizou-se o glutaraldeído 25 % (v/v), comercializado pela Vetec/SP.

A atividade hidrolítica da enzima solúvel e imobilizada foi determinada a partir da hidrolise do substrato p-nitrofenilbutirato (pNPB), adquirido junto a Sigma Chemical Company (St Loius, EUA).

Para reação de esterificação enzimática foram utilizados como substrato ácido oleico (Vetec/SP) e álcool etílico absoluto 99,5% (Synth/SP).

Para a análise de proteínas utilizou-se como reagente o Azul brilhante de Coomassie G 250 da marca Vetec/SP.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação e imobilização da enzima em organo-gel utilizando gelatina em pó

A metodologia utilizada foi adaptada de DALLA-VECCHIA *et al.*, (2004).

Adicionou-se 100 μL de enzima (27 U. g^{-1} de suporte) em 1 mL de água destilada e em seguida mediu-se 0,2g de gelatina, a mistura foi realizada em banho maria a 50°C , por um curto período de tempo necessário para dissolução da gelatina, não ocasionando desnaturação enzimática. Dissolveu-se 0,04g do tensoativo (SDS ou CTABr) em 4 mL da fase orgânica (hexano ou heptano). Os dois sistemas obtidos foram misturados e agitados por 10 minutos até formação de um sistema homogêneo. Após a formação do organo-gel, fez-se a pesagem do mesmo e armazenou-se em geladeira por 5 minutos (Figura 7).

Foi feita uma combinação entre os componentes, obtendo-se os seguintes derivados: GEL/SDS/HEX, GEL/SDS/HEP, GEL/CTABr/HEX, GEL/CTABr/HEP. Sendo GEL: gelatina, SDS: dodecilsulfato de sódio, HEX: hexano, CTABr: brometo de acetilmetilamônio, HEP: heptano.

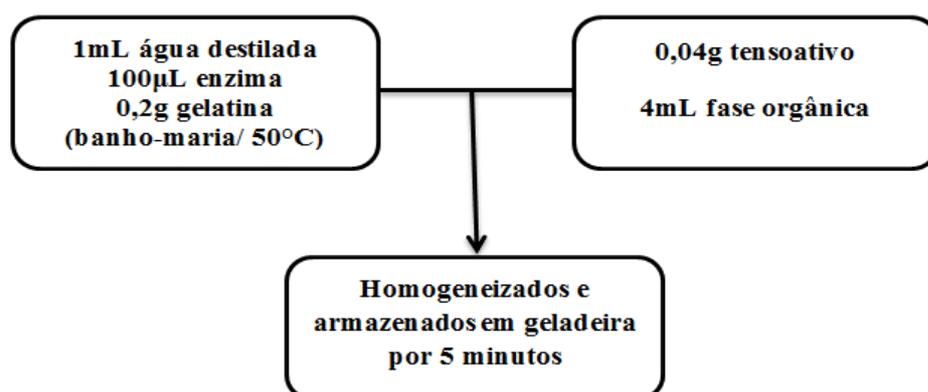


Figura 7-Fluxograma mostrando a preparação e imobilização da enzima em organo-gel à base de gelatina.

3.2.2 Preparação do organo-gel utilizando gelatina seguido de ativação com glutaraldeído 2% (v/v)

O preparo do organo-gel foi de acordo com o descrito no item (3.2.1), sem adição da enzima. Após a formulação, os organo-géis foram ativados com glutaraldeído 2% (v/v).

Os suportes foram lavados com água destilada e secos em bomba a vácuo, em seguida suspensos em soluções de glutaraldeído 2% (v/v) em tampão fosfato 20 mM, pH 8,0, sob agitação a 25°C por 10 minutos. Decorrido o tempo, o suporte foi lavado com água destilada para remoção do glutaraldeído residual, em seguida filtrado a vácuo de acordo com o fluxograma representado na Figura 8.

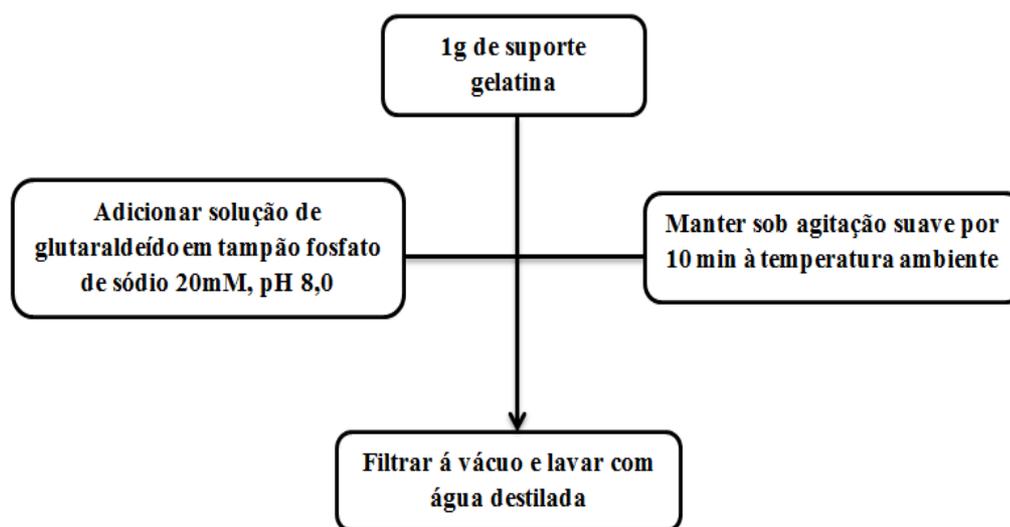


Figura 8-Fluxograma mostrando a preparação e ativação do organo-gel à base de gelatina via glutaraldeído 2% (v/v).

3.2.3 Preparação e imobilização da enzima em organo-gel utilizando alginato de sódio

Mediu-se 0,04g de alginato de sódio e dissolveu-se em 2 mL de água destilada, misturou-se por 10 minutos. Separadamente, mediu-se 0,04g do tensoativo, neste caso foi utilizado somente o SDS, pois o CTABr, nos organo-géis produzidos anteriormente, não obtiveram bons resultados, devido a provável desnaturação enzimática causada pelo

3. Materiais e Métodos.....Cavalcante, K.F.

tensoativo, e adicionaram-se 4 mL da fase orgânica(hexano ou heptano). As duas fases foram misturadas até obter-se uma fase homogênea. Em seguida, adicionou-se 180 µL da enzima (50 U/g de gel). Em seguida, o organo-gel foi submerso em solução de CaCl₂ 5% (m/v) por 5 minutos, para que ocorresse a coagulação do alginato e formação de partículas. Lavou-se o organo-gel com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 para retirada do excesso de CaCl₂ e com a fase orgânica (hexano ou heptano) para retirada do excesso de água e submetido a filtração a vácuo (Figura 9). Obtiveram-se os seguintes derivados: ALG/SDS/HEX, ALG/SDS/HEP. Sendo ALG: alginato, SDS: dodecilsulfato de sódio, HEX: hexano, HEP: heptano.

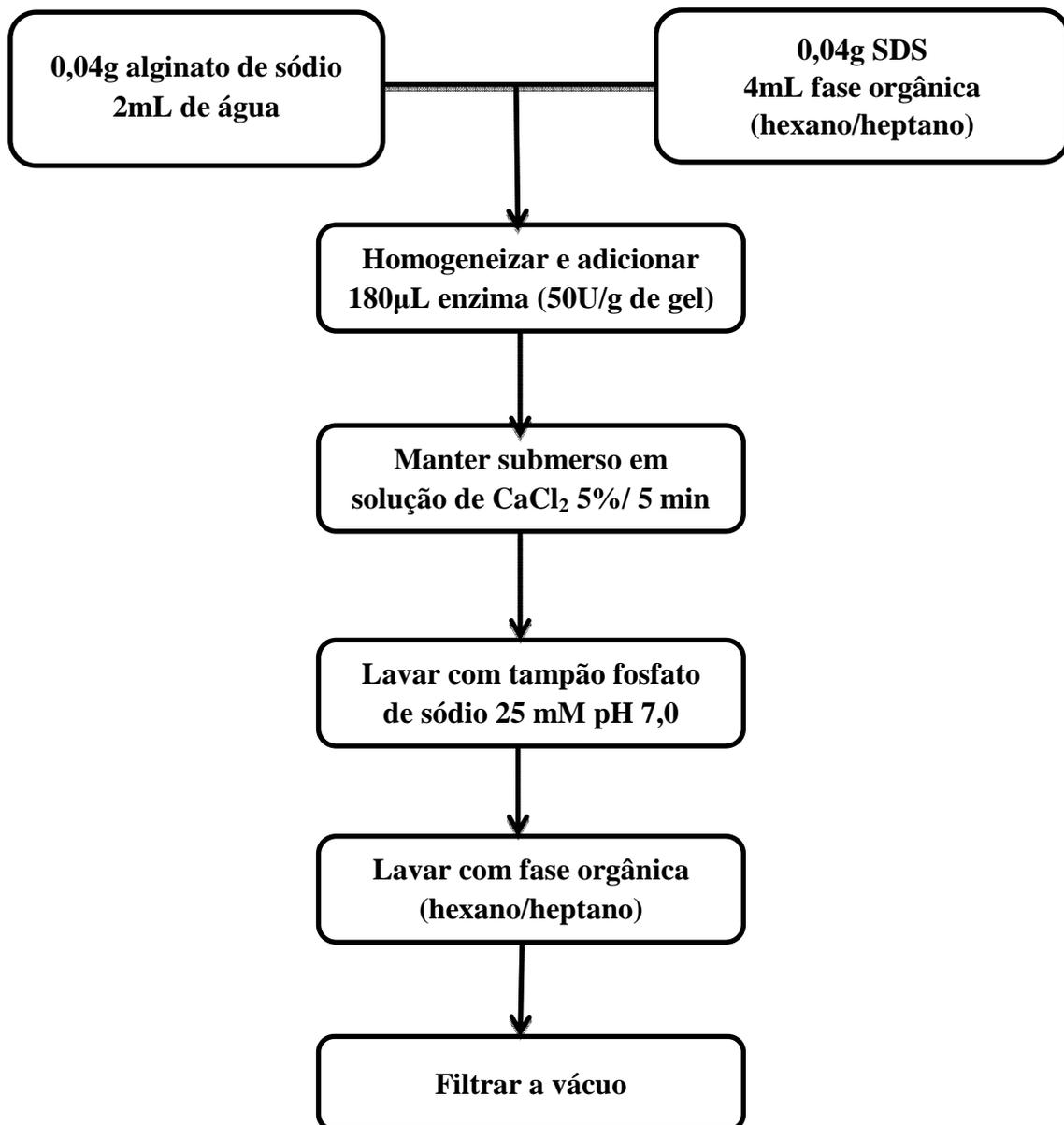


Figura 9-Fluxograma do preparo do organo-gel à base de alginato.

3.2.4 Preparação do organo-gel utilizando alginato de sódio seguido de ativação com glutaraldeído 2% (v/v)

O organo-gel foi preparado de acordo com o descrito no item anterior, sem adição da enzima. Posteriormente, foi realizado o processo de imobilização nos suportes produzidos.

Os suportes foram lavados com água destilada e secos em bomba a vácuo e suspensos em soluções de glutaraldeído 2% (v/v) em tampão fosfato 20 mM, pH 8,0, sendo a mistura colocada sob agitação a 25°C por 10 minutos. Decorrido o tempo, o suporte foi lavado com água destilada para remoção do glutaraldeído residual em seguida filtrado a vácuo.

3.2.5 Preparação e imobilização da enzima em organo-gel utilizando quitosana em pó

Preparou-se uma solução de ácido acético 5% (v/v), pH ajustado para 5,0 e nesta solução adicionou-se quitosana até concentração de 5% (m/v).

Mediu-se 0,04g do tensoativo SDS e dissolveu-se em 1 mL da fase orgânica (hexano ou heptano), em seguida, adicionou-se a enzima (50 U.g⁻¹ de suporte) e 4 g da solução de quitosana, agitando até completa homogeneização. O organo-gel foi colocado em geladeira por um período de 20 minutos, decorrido o tempo adicionou-se tampão bicarbonato de sódio 25 mM, pH 10,0 por 30 minutos, para que ocorresse a neutralização do pH e coagulação da quitosana, em seguida retirou-se o organo-gel e adicionou-se em álcool etílico 99,5% por 10 minutos, até ficar com consistência de gel, em seguida o derivado foi lavado com o solvente (hexano ou heptano) e seco em bomba a vácuo de acordo com o fluxograma representado na Figura 10.

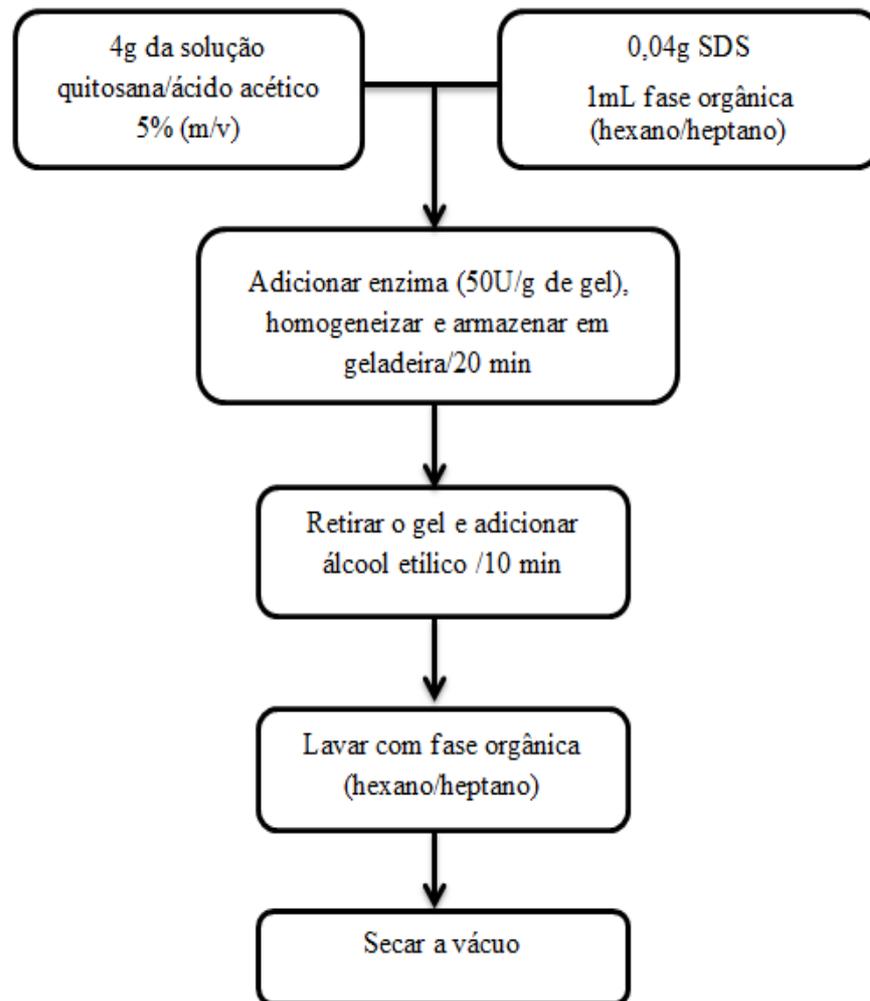


Figura 10-Fluxograma mostrando o preparo do organo-gel à base de quitosana.

3.2.6 Processo de imobilização da enzima ao suporte

A imobilização da lipase nos suportes ativados com glutaraldeído 2% (v/v) foi feita através do contato desses suportes com uma solução de enzima, carga oferecida 50 U/g de gel, dissolvida em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 8, na razão de 1/10 (m/v), incubados sob agitação suave em agitador rotativo a 25°C por um período de 3 horas. Decorrido tempo de imobilização, os derivados foram lavados com água destilada para remoção de enzima residual e secos em bomba a vácuo.

Obtiveram-se os seguintes derivados: GEL/SDS/HEX/GLU, GEL/SDS/HEP/GLU, GEL/CTABr/HEX/GLU, GEL/CTABr/HEP/GLU, ALG/SDS/HEX/GLU,

3. Materiais e Métodos.....Cavalcante, K.F.

ALG/SDS/HEP/GLU. Sendo GEL: gelatina, ALG: alginato, SDS: dodecilsulfato de sódio, HEX: hexano, GLU: glutaraldeído, CTABr: brometo de acetilmetilamônio, HEP: heptano.

Durante o processo de imobilização reservou-se uma alíquota da solução enzimática para verificação de uma possível queda da atividade enzimática. Essa alíquota foi mantida sob as mesmas condições de imobilização. Foram retiradas também alíquotas da solução enzimática sobrenadante ao final da imobilização para determinação da atividade hidrolítica residual.

3.2.7 Determinação de proteínas

O teor de proteína das preparações enzimáticas foi determinado pelo método de Bradford (1976), baseado na ligação do corante Azul brilhante de Coomassie G 250 à proteína.

3.2.8 Determinação da atividade hidrolítica da enzima solúvel e imobilizada

A atividade hidrolítica da lipase de *Rhizomucor miehei* solúvel e imobilizada foi determinada pela hidrólise do pNPB, avaliada espectrofotometricamente com comprimento de onda 400 nm.

O método consiste na preparação da solução de pNPB, onde 26 µL do substrato foram diluídos em 10mL de álcool isopropílico, 1 mL desta solução foi adicionada à 29 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0, adicionou-se 100 µL da solução de enzima, para determinação da atividade da enzima solúvel ou 0,2g de derivado, para determinação da atividade da enzima imobilizada, em seguida feita a medida de atividade à temperatura de 25°C, tempo de 10 minutos, medindo-se a absorbâncias de 2 em 2 minutos a fim de determinar a tangente da região linear (OLIVEIRA, 2012; CARNEIRO, 2013; SOUZA, 2013).

3. Materiais e Métodos.....Cavalcante, K.F.

A atividade enzimática foi obtida a partir da seguinte equação:

$$At = \frac{(\alpha - \alpha_{\text{branco}}) \times 0,0922 \times V_{\text{reator}}(\text{mL})}{V_{\text{enzima}}(\text{mL}) \text{ ou } m_{\text{derivado}}(\text{g})} \quad (1)$$

onde: At é a atividade enzimática (U/mL ou U/g), α é a tangente da amostra, α_{branco} é a tangente do branco, 0,0922 fator da curva de calibração, V_{reator} é o volume do reator (mL) e V_{enzima} é o volume da enzima (mL), m_{derivado} é a massa de derivado (g).

3.2.9 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da lipase solúvel e na forma imobilizada foi realizada à 60°C, para a avaliação da estabilização, dos diferentes derivados em relação à enzima solúvel, pois esta temperatura é considerada drástica para a maioria das lipases (OLIVEIRA, 2004).

Para a avaliação da estabilidade térmica da lipase na forma solúvel, adicionou-se 0,2 mL da enzima em 2 mL tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 incubadas à 60°C. As amostras foram retiradas em tempos estabelecidos e colocados em banho de gelo para interromper o processo de inativação e em seguida suas atividades foram determinadas.

Para os ensaios feitos com a enzima imobilizada, mediu-se 0,1g do derivado incubado em 1 mL da fase orgânica (hexano ou heptano), os derivados foram incubados em banho-maria à 60°C por um período de tempo estabelecido, retirados e colocados em banho de gelo. Em seguida, foi seco em bomba a vácuo e medida a atividade. (Figura 11).

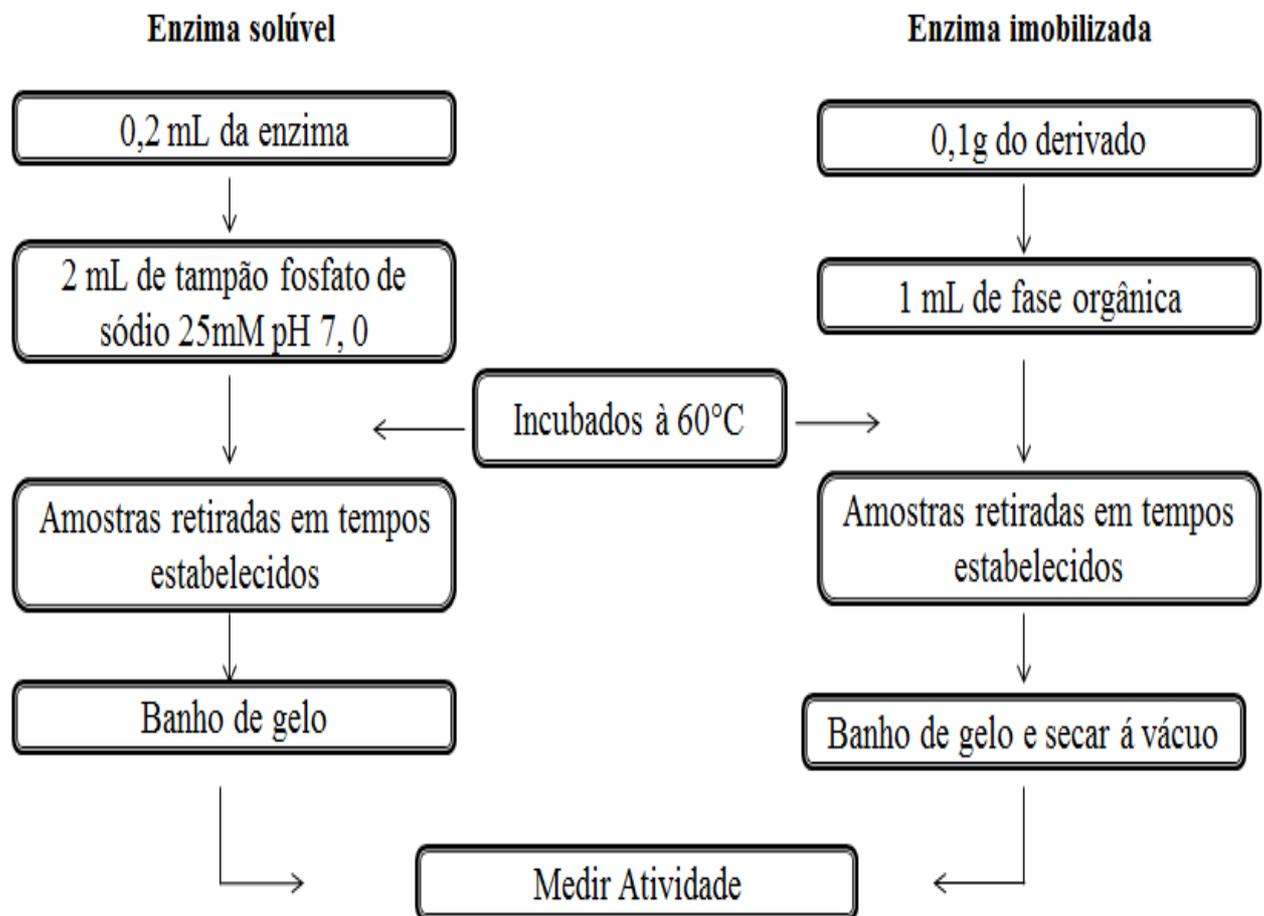


Figura 11-Fluxograma mostrando o processo de estabilidade térmica para a enzima solúvel e imobilizada.

3.2.9.1 Parâmetros de inativação térmica

Para a avaliação dos dados obtidos nos ensaios de estabilidade térmica, foi utilizado o ajuste exponencial não linear proposto por SADANA-HENLEY (1982), o modelo admite decaimento segundo uma reação de 1ª ordem para a fração $(1-\alpha)$ da enzima, sendo α uma constante conforme mostra a equação:

$$A_r = (1 - \alpha) \times e^{-kd \times t} + \alpha \quad (2)$$

onde: A_r é atividade relativa (adimensional), α é a relação entre a atividade específica no estado final e no estado inicial, kd é a constante de desativação de primeira ordem (tempo⁻¹).

3. *Materiais e Métodos*.....Cavalcante, K.F.

Primeiramente foi calculada a atividade relativa, definida como a razão entre a atividade enzimática do estado final (At_f) é a atividade enzimática do estado inicial (At_0), de acordo com a equação:

$$A_r = \frac{At_f}{At_0} \quad (3)$$

Através dos valores da atividade relativa plotou-se um gráfico atividade relativa versus tempo, em seguida estimou-se os parâmetros de estabilidade térmica kd e α .

O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial. O cálculo foi obtido através da equação:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln\left[\frac{(0,5 - \alpha)}{(1 - \alpha)}\right]}{Kd} \quad (4)$$

onde: $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida, α é a relação entre a atividade específica no estado final e no estado inicial, kd é a constante de desativação de primeira ordem (tempo^{-1}).

Depois de obtido o valor do tempo de meia-vida da enzima solúvel e do derivado determinou-se o fator de estabilização da enzima imobilizada. O fator de estabilidade é definido como a razão entre os tempos de vida do derivado e da enzima solúvel conforme equação:

$$FE = \frac{t_{1/2 \text{ derivado}}}{t_{1/2 \text{ enzima solúvel}}} \quad (5)$$

onde: FE é o fator de estabilidade, $t_{1/2 \text{ derivado}}$ é o tempo de meia-vida do derivado e $t_{1/2 \text{ enzima solúvel}}$ é o tempo de meia-vida da enzima solúvel.

3. *Materiais e Métodos*.....Cavalcante, K.F.

3.2.10 Determinação dos parâmetros de imobilização

Para os derivados obtidos através da preparação e imobilização da enzima determinou-se a eficiência, com base na atividade hidrolítica do derivado e na carga oferecida conforme a equação:

$$E(\%) = \frac{At_{derivado}}{Carga\ Oferecida} \times 100 \quad (6)$$

onde: E é a eficiência (%), $At_{derivado}$ é a atividade hidrolítica do derivado (U/g) e $carga\ oferecida$ no início da imobilização (U/g).

Para os derivados ativados com glutaraldeído 2% (v/v), determinou-se a eficiência de acordo com a equação anterior e o rendimento de imobilização com base na atividade hidrolítica da solução de enzima oferecida ao suporte e na atividade do sobrenadante, após o processo de imobilização, de acordo com a equação:

$$RI(\%) = \frac{(At_o - At_f)}{At_o} \times 100 \quad (7)$$

onde: RI é o rendimento de imobilização (%), At_o é a atividade oferecida no início da imobilização (U/g) e At_f é a atividade presente no sobrenadante (U/g).

3.2.11 Ensaios de carga máxima e eficiência

Foram selecionados os melhores derivados e feito ensaios de capacidade máxima de imobilização e analisando as atividades nas temperaturas de 15°C e 25°C, para verificação de possíveis efeitos difusionais em relação a velocidade das reações. As cargas enzimáticas oferecidas foram de 50 a 500 U/g de suporte. Em seguida, mediu-se a atividade dos derivados, suas eficiências foram determinadas conforme equação (6).

3.2.12 Avaliação da interação enzima-suporte sob estocagem a 10°C

A avaliação da interação enzima-suporte foi observada incubando-se os derivados obtidos em suas respectivas fases orgânicas, conservados em geladeira a 10°C. A cada sete dias a atividade dos derivados eram medidas de acordo com o item 3.2.5 sendo estes descartados após sua medição.

3.2.13 Aplicação de lipases imobilizadas na esterificação do ácido oleico

As reações de esterificação foram realizadas em erlenmeyer de 250 mL devidamente fechados, as quantidades de ácido oleico e etanol foram utilizados na proporção de 1:1 (m/v), mediram-se 10g de ácido oleico e 2,1 mL de etanol. A massa do biocatalisador foi calculada a partir da atividade do derivado, de modo a oferecer 1 U/g de suporte na reação. Os frascos foram mantidos sob agitação rotacional de 150 rpm a temperatura de 37°C por um período de 24 horas (SOUZA, 2013). (Figura 12).

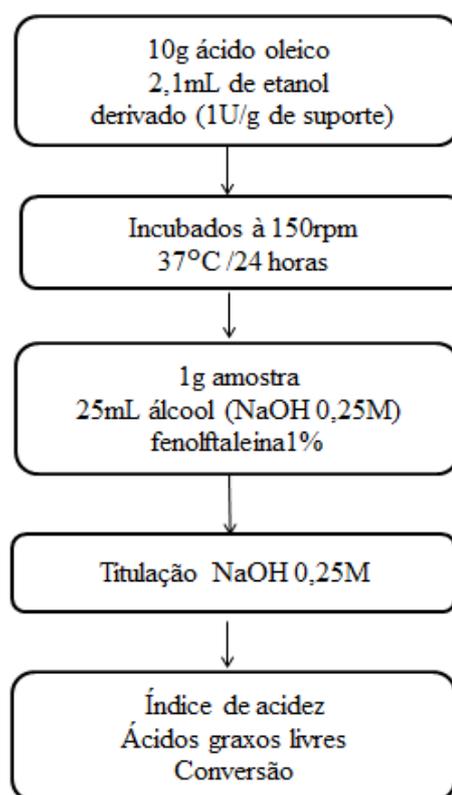


Figura 12-Fluxograma da reação de esterificação do ácido oleico.

3. *Materiais e Métodos*.....Cavalcante, K.F.

Após o tempo de reação, as amostras foram deixadas em repouso para decantar e a fase superior, rica em ésteres etílicos, foi separada e analisada. A avaliação da conversão da síntese foi avaliada a partir da medida do índice de acidez de alíquotas retiradas no início e no final da reação.

3.2.14 Índice de acidez e porcentagem de ácidos graxos livres

Para a determinação do índice de acidez e porcentagem de ácidos graxos livres baseou-se na metodologia proposta pela American *Oil Chemistry Society* (A.O.C.S) métodos oficiais Cd 3d-63 e Ca 5a-40, respectivamente. Consiste na utilização da solução de NaOH para titulação do ácido graxo livre na amostra segundo a metodologia descrita por MORETO e FETT (1998).

Ao final da reação de esterificação do ácido oleico, 1g das amostras foi dissolvido em 25 mL de álcool etílico comercial hidratado 92,8 °INPM neutralizado com NaOH 0,25M, utilizando como indicador fenolftaleína 1% m/v em etanol. Após a dissolução, as amostras foram tituladas com solução de NaOH 0,25M até o aparecimento da coloração rósea. O volume gasto de NaOH foi anotado, o índice de acidez e a porcentagem de ácidos graxos livres foram determinados conformes as equações:

$$IA \text{ (mg KOH/g)} = \frac{V \times f \times 56,11 \times M}{m} \quad (8)$$

$$\% \text{ AG}(\%) = \frac{V \times f \times 28,20 \times M}{m} \quad (9)$$

onde: *IA* é o índice de acidez (mg KOH/g), *V* é o volume de NaOH necessário para titular a amostra (mL), *f* é o fator de correção da solução de NaOH (aproximadamente 1), *M* é a molaridade da solução de NaOH (mol/L), *m* é a massa da amostra utilizada, 56,11 é o fator de correção com relação ao KOH, %AG é a porcentagem de ácidos graxos livres (%) e 28,20 é o fator de correção com relação ao ácido oleico.

3.2.14.1 Conversão

O cálculo da conversão foi feito a partir dos valores obtidos do índice de acidez no início (branco) e no final da reação de acordo com a equação:

$$X (\%) = \left(\frac{IA_o - IA_f}{IA_o} \right) \times 100 \quad (11)$$

onde: X é a taxa de redução do índice de acidez (%), IA_o é o índice de acidez no início da reação e IA_f é o índice de acidez no final da reação.

3.2.15 Variação da razão molar ácido/álcool

Para avaliar possíveis efeitos inibitórios na atividade dos derivados causados pelos substratos, foi feito um estudo variando a razão molar ácido/álcool, onde a concentração de ácido foi mantida fixa e variou-se a concentração de álcool. Foram avaliadas as seguintes razões molares 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20.

3.2.16 Efeito da remoção de água formada na reação

Para avaliação do efeito da retirada de água do meio reacional, foram utilizadas zeólitas. A quantidade de zeólita adicionada foi calculada conforme metodologia proposta por LUCENA (2008). Em uma reação de esterificação com conversão de 100 % e considerando que a zeólita possui a capacidade de absorção em água equivalente de 20 % em relação a sua massa. Utilizaram-se derivados com carga oferecida de 50 U/g de enzima oferecida, rotação de 150 rpm, a temperatura de 37 °C, variando-se as razões molares 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, o tempo de reação de 24 horas.

4. Resultados e discussão

Neste capítulo, serão apresentados os resultados e as discussões referentes aos experimentos realizados.

Serão apresentados os resultados da preparação dos derivados obtidos no processo de imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* em suportes desenvolvidos a base de polímeros como gelatina em pó, alginato de sódio, quitosana em pó na forma de organo-géis. Tais derivados foram caracterizados quanto à eficiência e fator de estabilidade. Em seguida, serão apresentadas as aplicações dos melhores derivados objetivando dados relacionados à carga máxima, estabilidade de estocagem a baixas temperaturas e reações de esterificação.

4.1 Atividade hidrolítica da enzima solúvel

Inicialmente foi medida a atividade hidrolítica da lipase de *Rhizomucor miehei*, apresentando um valor de $250,5 \pm 1,9 \text{ U}_{\text{PNPB}}.\text{mL}^{-1}$ de extrato enzimático ($6,87 \pm 0,01 \text{ mg}$ de Proteína. mL^{-1} de extrato enzimático).

4.2 Estabilidade térmica da lipase de *Rhizomucor miehei* na forma solúvel a 60°C

Os ensaios foram realizados em a 60° C. O processo de inativação da lipase de *Rhizomucor miehei* foi rápido. Observou-se que 50% da sua atividade catalítica caiu rapidamente, com tempo de meia-vida em torno de 0,4 minutos, de acordo com a Figura A1 no Anexo A.

A enzima quando está na sua forma solúvel, apresenta certa flexibilidade, que faz com que seu sítio ativo sofra mudanças conformacionais na maioria das vezes irreversíveis, fazendo com que a enzima perca sua atividade catalítica (CARNEIRO, 2013).

4.3 Caracterização da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em organo-géis à base de gelatina

Os derivados preparados a partir da gelatina em pó apresentaram resultados de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2-Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de gelatina, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e os tensoativos SDS ou CTABr. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e ($t_{1/2}$) Tempo de meia-vida.

Derivados	Carga Oferecida (U/g)	E (%)	At_{Der} ($U_{PNPB/g}$)	$t_{1/2}$ (min)	FE
Enzima solúvel	-	-	-	0,4	1,0
Gel/SDS/Hex	37,8 ± 1,4	4,1 ± 1,9	1,4 ± 0,3	12,7 ± 0,9	30 ± 2,6
Gel/CTABr/Hex	38,1 ± 4,7	0,7 ± 0,6	0,3 ± 0,2	nd	nd
Gel/SDS/Hep	53,0 ± 1,3	2,7 ± 0,9	1,5 ± 0,8	13,1 ± 8,4	31,2 ± 2,0
Gel/CTABr/Hep	61,2 ± 2,4	0,5 ± 0	0,3 ± 0,1	nd	nd

*nd: não determinado

Observa-se que o melhor derivado obtido foi usando SDS como tensoativo e hexano como fase orgânica visto que o valor de eficiência foi de 4,1 %, com fator de estabilidade de 30 vezes. O derivado Gelatina/SDS/Heptano apresentou uma eficiência mais baixa 2,7 %, quando comparado ao derivado Gelatina/SDS/Hexano, apesar de apresentar valores semelhantes de fator de estabilidade.

Observa-se também que não foi possível obter resultados de fator de estabilidade e tempo de meia-vida para os derivados preparados com o tensoativo brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTABr). As baixas eficiências apresentadas podem ser devido a efeitos difusionais, dificuldade de acesso do substrato à enzima, bem como as condições adversas de preparação do derivado que envolve os solventes promovendo a perda de atividade durante o processo. Baixos valores de eficiência também podem ser explicados pela inativação da enzima após utilização do tensoativo CTABr.

De acordo com FOLMER *et al.* (1997) e RODRIGUES (2010) o CTABr pode causar desnaturação da lipase de *Rhizomucor miehei* (RML). Em baixa concentração (0,00015%

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

m/v), os autores observaram um aumento na atividade da lipase solúvel. Após sucessivos incrementos deste detergente, observou-se um decréscimo nas atividades hidrolíticas determinadas. Em concentrações acima de 0,1% foi evidenciada uma completa inibição da atividade enzimática. Surfactantes carregados positivamente tendem a formar complexos com lipases de RML em uma grande faixa de pH, devido a combinação de atrações eletrostáticas e interações hidrofóbicas.

De acordo com estudos feitos por OLIVEIRA (2012), a presença do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS) no meio de imobilização pode causar alterações estruturais na molécula da enzima levando a uma estabilização de sua forma ativa, mesmo que haja a remoção do surfactante.

ZHANG *et al.*(2012) ao produzir organo-géis com o tensoativo CTABr, observou que os derivados apresentaram menores atividades, o que pode ser devido à forte interação entre o grupo catiônico na molécula do surfactante e a lipase carregada negativamente, o mesmo observado no presente trabalho. A interação pode induzir mudanças na estrutura da lipase, que pode resultar na redução da atividade.

A baixa atividade do derivado observada pode ser explicada devido à dificuldade de acesso da molécula do substrato ao sítio ativo da enzima, impedimento estérico, podendo ter sido causados pela má orientação durante o processo de imobilização, obstruindo o sítio ativo. Além deste fator, a própria molécula da enzima pode atuar como uma barreira limitando a difusão do substrato.

Pode-se constatar que nenhuma diferença significativa foi evidenciada quando as fases orgânicas hexano e heptano foram utilizadas. As duas fases orgânicas apresentam natureza química similar, são apolares e hidrofóbicos.

De acordo com JESUS *et al.* (1996) e OLIVEIRA (2012), a eficiência catalítica das enzimas diminui com o aumento da polaridade do solvente. Solventes hidrofílicos podem desnaturar a enzima por penetrarem nos núcleos hidrofóbicos ou pela remoção da camada de água que envolve a enzima, considerada essencial para a manutenção de sua atividade catalítica, modificando a sua estrutura natural.

Os perfis de inativação térmica a 60 °C dos biocatalisadores preparados através da imobilização em suportes à base de gelatina em pó estão representados na Figura A2 do Anexo A.

4.4 Caracterização da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em organo-géis à base de gelatina ativadas com glutaraldeído 2% (v/v)

Os suportes preparados à base de gelatina foram ativados com glutaraldeído e utilizados para imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei*, de acordo com o descrito no item 3.2.2. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos relativos ao fator de estabilidade, eficiência e tempo de meia-vida.

Tabela 3-Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis a base de gelatina, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e os tensoativo SDS ou CTABr, ativados com glutaraldeído 2% (v/v), incubados por 3 horas sob agitação e a temperatura ambiente. Carga oferecida 50 U.g-1 de suporte. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e ($t_{1/2}$) Tempo de meia-vida, (RI) Rendimento de imobilização.

Derivados	E (%)	At_{Der} (U _{PNPB} /g)	$t_{1/2}$ (min)	FE	RI (%)
Enzima solúvel	-	-	0,4	1,0	-
Gel/SDS/Hex/Glu	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,07	7,5 ± 0,4	17,8 ± 0,9	77,0 ± 2,4
Gel/CTABr/Hex/Glu	0,1 ± 0	0,06 ± 0	nd	nd	Nd
Gel/SDS/Hep/Glu	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,07	28,6 ± 1,1	68,3 ± 2,8	71,2 ± 6,2
Gel/CTABr/Hep/Glu	0,06 ± 0	0,03 ± 0	nd	nd	Nd

*nd: não determinado

Observa-se que o derivado que apresentou melhores resultados foi Gelatina/SDS/Heptano/Glutaraldeído devido ao fator de estabilidade de 68,3 vezes mais estável que a enzima solúvel, apresentando tempo de meia-vida e rendimento de 28,6 minutos e 71,2%, respectivamente. Já sua eficiência apresentou valor consideravelmente baixo, 0,8%. Estes resultados podem ser explicados devido ao aumento do número de grupos aldeídos aos quais são ligados aos grupos amino existentes na enzima. A Tabela 2 também mostra que o derivado Gelatina/SDS/Hexano/Glutaraldeído foi 17,8 vezes mais estável, com tempo de meia-vida de 7,5 minutos, rendimento de 77,0% e eficiência de 1,1%.

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

A diminuição nas atividades dos derivados obtidos pode ser pela redução do diâmetro dos poros do suporte após reticulação, devido à alta reatividade do glutaraldeído. Além disso, este agente de reticulação também pode reagir com outros grupos da enzima e um grande número de ligações entre os grupos ativos da enzima e do suporte podem ser estabelecidas promovendo distorções na estrutura terciária da enzima (SILVA *et al.*, 2012).

A imobilização de enzimas em suportes ativadas com glutaraldeído é extremamente rápida, devido à alta reatividade desse agente ativante (ALONSO, 2005). Estudos recentes têm mostrado que diferentes concentrações de glutaraldeído utilizadas na ativação de suportes podem resultar na obtenção de biocatalisadores com diferenças significativas em suas propriedades tais como atividade e estabilidade térmica (SILVA *et al.*, 2012).

Estudos feitos por OLIVEIRA (2012) indicam que o melhor derivado, em termos de atividade recuperada e estabilidade térmica a 60°C, foi obtido quando a ativação do suporte foi efetuada em baixa concentração de glutaraldeído (0,6% v/v). O derivado obtido foi 65 vezes mais estável do que a enzima solúvel, apresentando tempo de meia vida de 0,64 minutos.

Pode-se constatar que não houve nenhuma diferença significativa quanto ao uso das fases orgânicas hexano e heptano, por apresentarem características semelhantes de polaridade e hidrofobicidade.

Para os demais derivados não foi possível determinar os valores de fator de estabilidade, tempo de meia-vida e rendimento e suas eficiências obtiveram valores menores que 0,2%. Este resultado se deve ao uso do tensoativo brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTABr) exercer um efeito negativo na atividade enzimática. Em organo-géis, a interação eletrostática entre as moléculas anfifílicas e moléculas de enzima na interface poderia desempenhar um papel importante na atividade da enzima. Surfactantes se comportam como a interface entre a fase orgânica e enzima tampão, proporcionando primeiro nível de proteção para a enzima retida dentro da micela (WEI-WEI ZHANG, 2012).

A Figura A3 do Anexo A mostra os perfis de inativação térmica a 60 °C dos biocatalisadores preparados através da imobilização em suportes à base de gelatina em pó ativados com glutaraldeído 2%.

4.5 Caracterização da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em organo-géis à base de alginato de sódio

A Tabela 4 apresenta os resultados relativos aos derivados preparados à base de alginato de sódio. Conforme estudado anteriormente, a utilização do tensoativo brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTABr), tornou-se inviável devido ao efeito negativo na atividade hidrolítica da enzima, baseado nisto, os estudos seguem somente com a utilização do tensoativo dodecilsulfato de sódio (SDS).

Tabela 4-Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de alginato de sódio, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e o tensoativo SDS. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e ($t_{1/2}$) Tempo de meia-vida.

Derivados	Carga Oferecida(U/g)	E (%)	At_{Der} ($U_{PNPB/g}$)	$t_{1/2}$ (min)	FE
Enzima solúvel	-	-	-	0,4	1,0
Alg/SDS/Hex	18,2 ± 0,8	4,3 ± 0,7	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,2	1,3 ± 0,7
Alg/SDS/Hep	14,1 ± 0,6	6,0 ± 1,0	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,2

Observando-se a Tabela 4, verifica-se que os derivados produzidos obtiveram resultados bem próximos, o derivado Alginato/SDS/Heptano destaca-se por apresentar uma maior eficiência que o Alginato/SDS/Hexano, 6,0% e 4,3 %, respectivamente. Observa-se que os dois derivados obtiveram valores de fator de estabilidade de aproximadamente 1,3 vezes.

Verificou-se também que a consistência do gel depende da concentração da solução precipitante de cloreto de cálcio. A consistência do organo-gel feito com alginato apresentou aspecto macroscópico mais rígido, quando comparado com os demais derivados. A consistência e estabilidade do gel é um fator importante, pois provavelmente o processo reacional é controlado por difusão, e um gel muito rígido provocaria um aumento na barreira difusional o que afetaria o rendimento das reações. Devido a esse fato pode-se observar que

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

os derivados apresentaram valores baixos de atividade, conseqüentemente, uma redução na eficiência.

Resultados obtidos por YADAV *et al.* (2012) mostraram que uma maior concentração de alginato de sódio acarretou na redução da perda de enzima, por resistir à força de cisalhamento, com isso a atividade da enzima poderá permanecer estável durante todo o processo de reação.

No entanto a estabilidade mecânica de polímeros de alginato ainda precisa ser melhorada e diferentes abordagens têm sido utilizadas para superar este problema, como por exemplo, a mistura desse polímero com álcool polivinílico ou carboximetilcelulose (HANNU LEINO *et al.*, 2012).

A concentração de cloreto de cálcio na solução precipitante pode ter influenciado negativamente para a taxa de imobilização, inativando a enzima e conseqüentemente diminuindo sua eficiência.

Observou-se também, como verificado nos derivados anteriormente analisados, que não houve nenhuma diferença significativa quanto ao uso das fases orgânicas hexano e heptano, devido a suas características semelhantes. Os parâmetros analisados apresentaram valores bem próximos para os dois derivados.

Os perfis de inativação térmica a 60 °C dos biocatalisadores preparados através da imobilização em suportes à base de alginato de sódio estão representados na Figura A4 do anexo A.

4.6 Caracterização da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em organo-géis à base de alginato de sódio ativadas com glutaraldeído 2% (v/v)

A Tabela 5 mostra que o derivado Alginato/SDS/Hexano/Glutaraldeído apresentou valores de rendimento e eficiência 82,6 % e 0,5 % m/v, respectivamente. Já Alginato/SDS/Heptano/Glutaraldeído apresentaram valores de rendimento 60,6 % e eficiência 1,0 %. Pode-se dizer que quantidades de glutaraldeído na etapa de reticulação do suporte provocaram uma diminuição na atividade dos derivados, bem como, uma redução nos tempos de meia-vida dos biocatalisadores produzidos.

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

Tabela 5-Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de alginato de sódio, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e o tensoativo SDS, ativados com glutaraldeído 2% (v/v), incubados por 3 horas sob agitação e a temperatura ambiente. Carga oferecida 50 U.g-1 de suporte. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e ($t_{1/2}$) Tempo de meia-vida, (RI) Rendimento de imobilização.

Derivados	E (%)	At_{Der} (U_{PNPB}/g)	$t_{1/2}$ (min)	FE	RI (%)
Enzima solúvel	-	-	0,4	1,0	-
Alg/SDS/Hex/Glu	$0,5 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,06$	$0,1 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,1$	$82,6 \pm 5,5$
Alg/SDS/Hep/Glu	$1,0 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,04$	$60,6 \pm 1,9$

A ativação com glutaraldeído produz suportes com elevados valores de rendimento de imobilização, mas não foram observados altos valores para eficiência, fator de estabilidade e tempo de meia-vida. Durante o processo de imobilização, efeitos de distorção da estrutura ativa da enzima também podem ter ocorrido, causando uma má orientação durante a imobilização. Essa distorção da enzima pode ser consequência da alta reatividade das moléculas de glutaraldeído, essa reatividade é capaz de formar dímeros, trímeros ou polímeros insaturados alfa e beta entre suas moléculas (MENDES, 2009).

Quando há uma menor quantidade de moléculas de glutaraldeído ligadas ao suporte o efeito da limitação difusional é menor, desta forma uma maior quantidade de substrato consegue alcançar o sitio ativo da enzima (CARNEIRO, 2013).

Estudos feitos por SILVA *et al.* (2013), mostraram que a utilização de alginato em suportes produzidos com quitosana, suportes híbridos, acarretou uma diminuição bastante significativa do rendimento de imobilização, o que se deve ao fato desses suportes compósitos apresentarem uma menor quantidade de grupos amino disponíveis para ligação da enzima por volume total de suporte.

De acordo com CARNEIRO (2013), lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em suportes híbridos obtidos com a adição de alginato, apresentaram atividade de 3,98 U/g de suporte, mostrando que os efeitos desnaturantes provocados por distorção da enzima imobilizada foram menos intensos, pois as enzimas permaneceram em sua forma ativa. Tal

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

fato não foi observado no presente estudo, pois o alginato, por ser mais rígido que os demais derivados, dificultou a difusão do substrato, levando a baixos valores de atividade e conseqüentemente redução na eficiência.

A presença de diferentes grupos reativos em cada polímero e a diferença de reatividade dos ativadores permite diferentes interações enzima-suporte. Além de grupos hidroxila, os polímeros apresentam outras funções reativas como, por exemplo, grupos amino da quitosana, grupos ácidos no alginato (ADRIANO *et al.*, 2008).

A escolha da fase orgânica hexano ou heptano também não acarretou diferenças significativas. Os parâmetros analisados apresentaram valores bem próximos para os dois derivados.

A Figura A5 do Anexo A mostra os perfis de inativação térmica a 60 °C dos biocatalisadores preparados através da imobilização em suportes à base de alginato de sódio ativados com glutaraldeído 2% v/v.

4.7 Caracterização da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em organo-géis à base de quitosana

De acordo com a Tabela 6, pode-se observar que os derivados à base de quitosana obtiveram resultados bem próximos, tendo maior destaque o derivado Quitosana/SDS/Heptano, pois apresentou melhores resultados, quando comparado com o derivado Quitosana/SDS/Hexano, de fator de estabilidade e tempo de meia-vida de 2,3 e 1,0 minutos, respectivamente. As eficiências de ambos os derivados apresentaram valores em torno de 1,0%. Observou-se também, que não houve diferença significativa quanto ao uso das fases orgânicas hexano e heptano. Os parâmetros analisados também apresentaram valores bem próximos para os dois derivados.

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

Tabela 6-Caracterização de lipases imobilizadas em organo-géis à base de quitosana, utilizando hexano ou heptano como fases orgânicas e o tensoativo SDS. Carga oferecida 50 U.g⁻¹ de suporte. Sendo (At_{Der}) Atividade do derivado, (E) Eficiência, (FE) Fator de estabilidade e (t_{1/2}) Tempo de meia-vida.

Derivados	E (%)	At _{Der} (U _{PNPB} /g)	t _{1/2} (min)	FE
Enzima solúvel	-	-	0,4	1,0
Qui/SDS/Hex	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,05	0,8 ± 0,08	1,8 ± 0,2
Qui/SDS/Hep	1,0 ± 0,07	0,5 ± 0,03	1,0 ± 0,3	2,3 ± 0,6

As atividades dos derivados e eficiências apresentaram valores baixos devido ao transporte de massa, impedimento estérico, assim com prováveis deformações na estrutura da enzima durante o processo de imobilização, como verificado em vários estudos (ADRIANO, 2008; OLIVEIRA, 2012; CARNEIRO, 2013).

Estudos feitos por CARNEIRO (2013) observou-se que ao utilizar quitosana como suporte, os biocatalisadores também apresentaram valores relativamente baixos de atividade recuperada e atividade do derivado com 7,83 % e 1,46 U/g, respectivamente, para derivados com quitosana 2,5 %. E para suportes com quitosana 5,0 % a atividade recuperada e a atividade do derivado diminuíram para 4,54 % e 0,88 U/g, respectivamente.

Os perfis de inativação térmica a 60 °C dos biocatalisadores preparados através da imobilização em suportes à base de quitosana estão representados na Figura A6 do anexo A.

4.8 Determinação dos melhores biocatalisadores

Com base nos estudos feitos com os 14 derivados produzidos a partir dos polímeros gelatina, alginato e quitosana, selecionaram-se os três melhores biocatalisadores, Gelatina/SDS/Hexano, Alginato/SDS/Heptano, Quitosana/SDS/Heptano, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 7.

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

Tabela 7-Seleção dos melhores biocatalisadores. Sendo (E) Eficiência, ($t_{1/2}$) tempo de meia-vida e (FE) Fator de Estabilidade.

Derivados	E (%)	$t_{1/2}$ (min)	FE
Gel/SDS/Hex	$4,1 \pm 1,9$	$12,7 \pm 0,9$	$30,0 \pm 2,6$
Alg/SDS/Hep	$6,0 \pm 1,0$	$0,5 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$
Qui/SDS/Hep	$1,0 \pm 0,07$	$1,0 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,6$

Apesar de todos os derivados produzidos apresentarem valores estatisticamente iguais, foram selecionados os biocatalisadores produzidos pelo método de microencapsulação, onde a enzima encontra-se confinada dentro do centro micelar dos organo-géis, representados na Figura 13. Desta forma, prosseguiu-se com estes biocatalisadores para as demais análises.

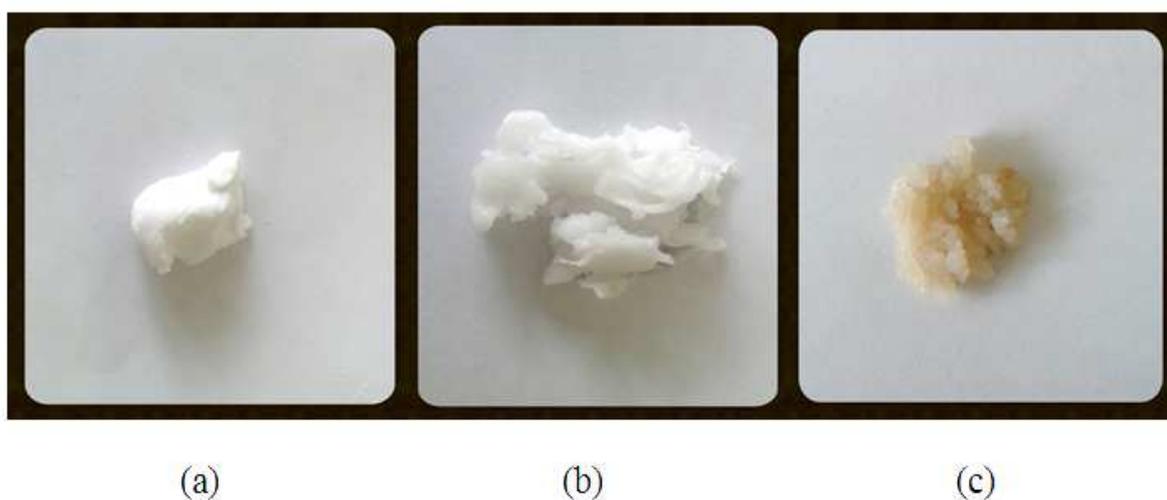


Figura 13-Estrutura macroscópica dos organo-géis, (a) Gel/SDS/Hex, (b) Alg/SDS/Hep, (c) Qui/SDS/Hep.

4.9 Ensaio de carga máxima e eficiência

Foram realizados ensaios de imobilização para investigar a carga máxima de enzima que pode ser imobilizada por massa de suporte, visando obter uma alta concentração de enzima imobilizada nos melhores derivados obtidos.

A distribuição da enzima imobilizada no suporte está diretamente relacionada com a carga enzimática oferecida. Estudos revelam que quanto maior a concentração de enzima na solução utilizada para imobilização mais heterogênea é a distribuição interna da enzima imobilizada, que tende a se acumular nas camadas mais superficiais da partícula do suporte, interferindo tanto na quantidade de enzima imobilizada quanto na atividade imobilizada medida (RODRIGUES *et al.*, 2008; CARNEIRO, 2013).

Para elevadas concentrações enzimáticas o número de ligações de cada enzima ao suporte tende a reduzir, porém se a quantidade de enzima for muito baixa, o elevado número das ligações enzima-suporte pode ocasionar a perda de atividade do derivado imobilizado por distorção da estrutura enzimática. Isto depende também da densidade de grupos ativos na superfície do suporte (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Estudou-se também o parâmetro eficiência (E), relação entre atividade do derivado (At_{der}) e a carga oferecida (U/g de suporte), avaliando seu decréscimo de acordo com o aumento da carga oferecida. Os ensaios de carga máxima foram realizados para avaliar possíveis efeitos de difusão nas velocidades das reações nas temperaturas de 15°C e 25°C. A velocidade intrínseca da reação aumenta exponencialmente com o aumento da temperatura e a difusividade molecular varia linearmente (ADRIANO, 2008).

4.9.1 Carga máxima dos derivados a temperatura de 15°C e 25°C

A Figura 14 apresenta a relação entre a atividade do derivado e a carga oferecida, para o derivado Gelatina/SDS/Hexano, nas temperaturas de 15°C e 25 °C.

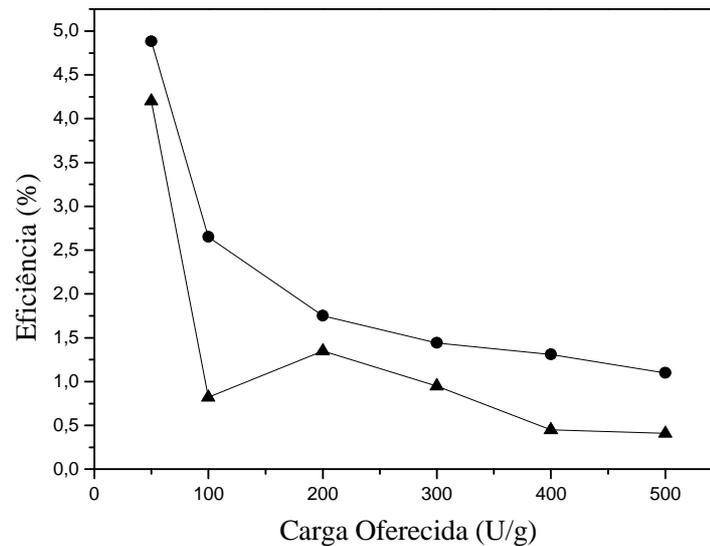


Figura 14-Efetividade em função da carga oferecida para o derivado Gelatina/SDS/Hexano. (▲) temperatura de 15°C; (●) temperatura de 25°C.

Observa-se que para uma carga inicial de 50 U.g⁻¹ de suporte, o derivado Gelatina/SDS/Hexano obteve o valor máximo atingido de 4,2 % e 4,8 % nas temperaturas de 15°C e 25 °C, respectivamente. Nota-se, como esperado, que a eficiência diminui à medida que aumenta a carga oferecida. Com o aumento da carga enzimática oferecida houve um aumento da velocidade de reação e redução da difusividade do substrato nos poros do gel, reduzindo a eficiência.

ZHANG *et al.* (2012) realizaram estudos com lipases de *Candida rugosa* imobilizadas em organo-géis à base de gelatina. As atividades dos derivados foram medidas através da reação de transesterificação de 2-fenil-etanol e acetato de vinilo. Observou-se que a taxa de transesterificação diminuiu com o aumento da carga enzimática. Tal fato pode ser explicado devido à concentração excessiva de enzima promoveu fortes agregados, reduzindo sua eficiência.

A Figura 15 apresenta a relação entre a atividade do derivado e a carga oferecida, para o derivado Alginato/SDS/Heptano, nas temperaturas de 15°C e 25°C.

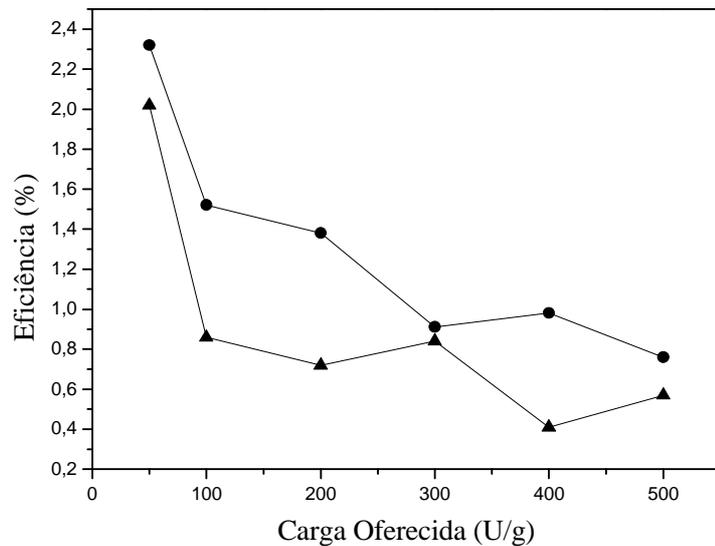


Figura 15-Efetividade em função da carga oferecida para o derivado Alginato/SDS/Heptano, nas temperaturas de 15°C e 25°C. (▲) temperatura de 15°C; (●) temperatura de 25°C.

O derivado Alginato/SDS/Heptano apresentou, com carga de 50 U.g⁻¹, valores máximos de 2,0 % e 2,3% de eficiência nas temperaturas de 15°C e 25°C, respectivamente, tendo um decaimento à medida que a carga oferecida aumenta.

Segundo ADRIANO (2008), durante um tempo fixo de imobilização, uma diminuição significativa no rendimento de imobilização é obtida quando a concentração de enzima em solução é aumentada. Este comportamento pode ser devido a uma combinação de difusão e exclusão existentes na entrada dos poros.

A Figura 16 apresenta o Gráfico referente à eficiência (E), para o derivado Quitosana/SDS/Heptano, nas temperaturas de 15°C e 25°C.

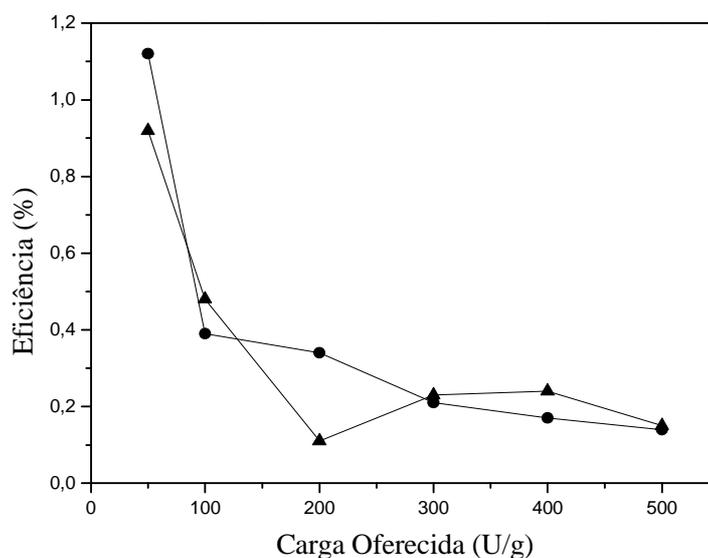


Figura16-Efetividade em função da carga oferecida para o derivado Quitosana/SDS/Heptano, nas temperaturas de 15°C e 25°C. (▲) temperatura de 15°C; (●) temperatura de 25°C.

Pode-se observar que o derivado Quitosana/SDS/Heptano, como os demais derivados, também apresentou valores máximos de eficiência, com carga inicial de 50U.g⁻¹, de 0,9% e 1,1% nas temperaturas de 15°C e 25°C, respectivamente.

Apesar de apresentarem valores relativamente mais altos, medidos na temperatura de 25°C, nota-se que a variação na temperatura não acarretou mudanças significativas nos valores de eficiência de todos os derivados analisados, não apresentando efeitos difusionais. Além disso, pode ter ocorrido desnaturação no processo de imobilização, acarretando na redução nas eficiências.

Observa-se que com o aumento da carga oferecida, as atividades dos derivados por grama de suporte não foi alterada significativamente, visto que se tem mais enzima imobilizada, mas com praticamente a mesma atividade. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que estaria ocorrendo à imobilização de várias camadas de enzima sobre o suporte, o que dificultaria a difusão dos substratos para o sítio ativo das enzimas encontradas em camadas mais inferiores, acarretando em uma redução nas suas eficiências.

O mesmo foi observado por OLIVEIRA (2012), em estudos feito com lipases de *Rhizomucor miehei*, verificou-se que os rendimentos máximos de reação para síntese de ésteres foram observados quando a carga enzimática oferecida foi de 50 U.g⁻¹ de suporte, a partir deste valor, cargas adicionais oferecidas ao suporte utilizado não promoveram

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

mudanças significativas nos rendimentos obtidos que, após uma leve diminuição, permaneceram praticamente inalterados, provavelmente devido a restrições difusionais dos substratos ao sítio ativo das enzimas localizadas no interior do biocatalisador.

Segundo estudos realizados por CARNEIRO (2013), com lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em quitosana 2,5 %, ativado com glutaraldeído, foi observada que as atividades teóricas dos derivados aumentaram com a quantidade de atividade oferecida (25 a 65U/g), indicando que o suporte teria uma capacidade maior para imobilização de enzima, porém ocorreu uma redução dos valores de atividade recuperada (92,85 a 64,34 %) e efetividade (0,93 a 0,64), a partir do aumento da quantidade de atividade oferecida, evidenciando a ocorrência de possível saturação deste suporte.

4.10 Aplicação de lipases imobilizadas na esterificação do ácido oleico

A síntese de ésteres de ácidos graxos por esterificação do ácido oleico com álcool etílico, álcool de cadeia curta, foi utilizada com o intuito de avaliar a aplicação da lipase imobilizada em organo-géis, variando-se as concentrações molares de ácido/álcool. Utilizaram-se também agentes dessecantes, zeólitas, para verificação do efeito da retirada de água das reações.

4.10.1 Esterificação do ácido oleico variando a razão molar ácido/álcool

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram os perfis de conversão em função da razão molar ácido/álcool na síntese do oleato de etila a partir do ácido oleico e do etanol, para os três melhores derivados obtidos nos estudos de imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* em organo-géis.

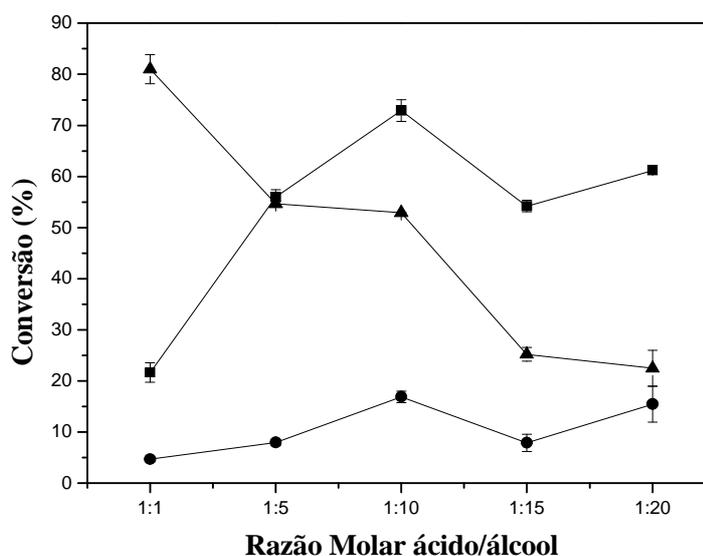


Figura 17-Perfis de conversão em função da variação da razão molar ácido/álcool na reação de síntese do oleato de etila, carga enzimática com 1 U. g⁻¹, 150 rpm e 37°C, tempo de reação 24horas, para os derivados (■) Gelatina/SDS/Hexano,(●) Alginato/SDS/Heptano e (▲) Quitosana/SDS/Heptano

De acordo com o Gráfico pode-se observar que para os derivados Gelatina/SDS/Hexano e Alginato/SDS/Heptano a maior conversão foi alcançada com a razão molar ácido/álcool 1:10 com 72,9% e 16,9 %, respectivamente.

Segundo CENI *et al.* (2010), o aumento da concentração de um dos reagentes pode deslocar o equilíbrio no sentido da formação de produtos, resultando em altas conversões ou por efeito de inibição tanto dos substratos como dos produtos da reação podem diminuir o rendimento das mesmas. Acima da razão de 1:10 nota-se uma diminuição nas conversões que pode ser causada pela inibição do álcool, levando a modificação na conformação da enzima impedindo a catálise.

Pode-se observar que o derivado produzido à base de alginato apresentou baixas conversões. Tal fato pode ser explicado pela ocorrência de efeitos difusionais, devido o alginato ser mais rígido e possuir poros mais fechados, dificultado o acesso do ácido e do álcool ao sítio ativo da enzima, com isso, diminuindo a conversão.

Em estudos sobre esterificação do ácido oleico com etanol realizados por SANTOS (2011), verificou-se que ao variar as razões molares ácido/álcool (1:2,5; 1:4,5; 1:6,5) os valores de conversão obtidos foram bem próximos. No entanto, notou-se que os valores com a

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

menor relação de razão molar apresentaram as maiores taxas de conversão, indicando a não necessidade de um excesso estequiométrico, tornando o processo enzimático, nesse aspecto, mais vantajoso que a catálise química convencional.

Pode-se observar que para o derivado Quitosana/SDS/Heptano a máxima conversão foi de 80,0% na razão molar ácido/álcool de 1:1, tendo um decréscimo nas demais razões molares. Em estudos realizados por CARNEIRO (2013), observou-se que lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em suportes à base de quitosana, utilizadas na esterificação do óleo de coco com etanol, apresentaram conversões em torno de 51,8%, na razão molar 1:1, apresentando um decaimento com o aumento da quantidade de álcool.

De acordo com OLIVEIRA (2011) utilizando RML imobilizadas em quitosana, a máxima conversão em éster (85%) foi observada quando a razão molar ácido/álcool foi 1:1 para concentrações de ácido butírico e etanol tendo um decréscimo à medida que a razão molar aumentava. Observou-se que na razão ácido/álcool de 1:4 o rendimento de reação foi de 40,0%. SOUZA (2013) em estudos feito com lipases de *Candida antarctica* imobilizadas em nanopartículas magnéticas também observou que o máximo de conversão de butirato de etila e metila obtido foi alcançado na razão molar ácido/álcool de 1:1, o excesso de álcool não alterou drasticamente a síntese dos ésteres.

A queda na conversão do derivado à base de quitosana, após variação da razão molar pode ser explicada pelo excesso de álcool, o que pode ter provocado a inativação da enzima, pois esta pode sofrer inibição pelo álcool. O suporte no qual a enzima foi imobilizada pode ter adsorvido o etanol, que é um composto bastante polar, promovendo a formação de uma camada estagnada desse substrato em torno da enzima imobilizada. Assim, impedindo a entrada do ácido graxo ao sítio ativo da enzima. Além disso, o álcool pode ter removido a camada de água necessária para a manutenção da integridade estrutural da enzima, distorcendo a sua estrutura tridimensional (PAIVA *et al.*, 2000; SAMUKAWA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Álcoois de baixa massa molecular como o metanol ou etanol podem ser acumulados no microambiente aquoso da enzima, atingindo uma concentração suficientemente elevada para induzir a desnaturação da proteína bloqueando a porção nucleofílica do seu sítio ativo (LAANE *et al.*, 1987; ZAID *et al.*, 2002).

TRUBIANO *et al.*(2007), avaliaram a síntese de ésteres de ácidos graxos utilizando a lipase de *Candida antarctica*, verificaram o mesmo efeito para a razão molar. WANG *et al.* (2007), ao estudarem a produção enzimática de biodiesel a partir de óleos residuais ácidos,

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

também observaram que uma quantidade excessiva de álcool diminui a velocidade inicial de reação e tem um efeito negativo na enzima.

4.10.2 Esterificação do ácido oleico variando a razão molar ácido/álcool com utilização de zeólitas

Para a avaliação do efeito da remoção da água foram adicionadas zeólitas ao meio reacional. Segundo FORESTI *et al.* (2007), a quantidade de água em reações de esterificação e hidrólise pode afetar a conversão de equilíbrio e a distribuição dos produtos no meio, à medida que a concentração de água aumenta a conversão de ésteres diminui. Como resultado, a água age como substrato na reação inversa de hidrólise.

A Figura 18 mostra que com a adição da zeólita houve um aumento na conversão de 21,6% para 79,0% na razão 1:1 e 56,0% para 79,0% na razão de 1:5, para o derivado Gelatina/SDS/Hexano, tendo um decréscimo nas demais razões. A adição de zeólita não resultou aumento da conversão para o derivado Alginato/SDS/Heptano. Em sua melhor conversão alcançada na razão de 1:10, ao utilizar o agente dessecante houve redução de 16,9% para 9,2%.

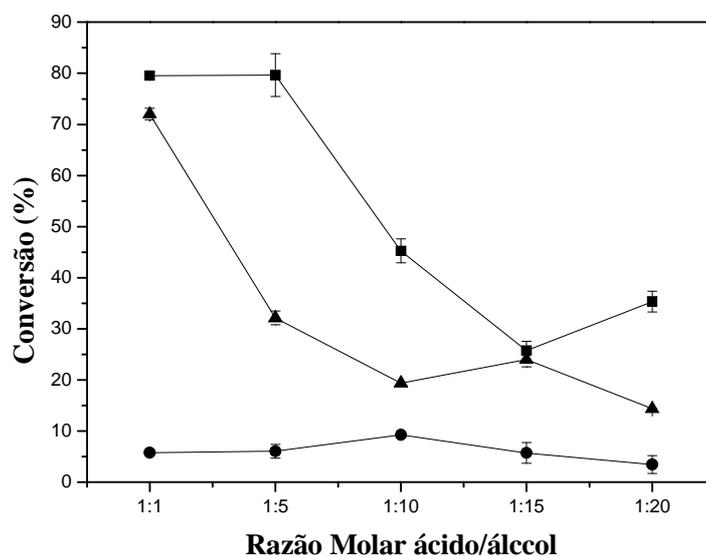


Figura 18-Perfis de conversão em função da variação da razão molar ácido/álcool na reação de síntese do oleato de etila, com adição de zeólitas, carga enzimática com 1 U. g⁻¹, 150 rpm e 37°C, tempo de reação 24horas, para os derivados (■) Gelatina/SDS/Hexano,(●) Alginato/SDS/Heptano e (▲) Quitosana/SDS/Heptano.

4. Resultados e Discussão.....Cavalcante, K.F.

Pode-se observar que a adição de zeólita nas reações com o derivado Quitosana/SDS/Heptano diminuiu a conversão em todas as razões molares. O mesmo foi observado por CARNEIRO (2013), ao utilizar lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em quitosana. Uma redução na conversão quando foi adicionada zeólita ao meio reacional foi observada, provavelmente, a zeólita retirou toda a água presente no meio reacional, inclusive a água necessária para a estrutura da enzima.

OLIVEIRA (2012) também realizou estudos com a mesma lipase imobilizada em quitosana, utilizando como agente dessecante peneira molecular 4A para a síntese de butirato de etila. A presença do agente dessecante promoveu reduções significativas nas taxas de conversão em éster, o rendimento que na ausência deste dessecante foi de 89%, foi reduzido para 46%.

Em estudos realizados por SANTOS (2011), observou-se na esterificação do ácido oleico, a melhor conversão de 46,8% a 29,9 °C, razão molar ácido/álcool de 1:4,5 durante 6,5 horas com lipase de *Candida Antarctica* tipo B imobilizada em quitosana. Ao utilizar uma peneira molecular zeólita do tipo A, a conversão foi 53,0% para o tempo de 6,5 horas. Portanto, com a utilização do agente dessecante não houve uma melhora tão substancial como se esperava, pois a retirada da água que é produzida durante o processo de esterificação no meio reacional favorece a conversão de ésteres etílicos.

4.11 Avaliação da interação enzima-suporte sob estocagem a 10°C

Realizaram-se ensaios com o intuito de avaliar o potencial catalítico dos biocatalisadores, em condições favorável de temperatura.

Desta forma, realizou-se estocagem dos derivados a 10°C, por um período de 100 dias, sendo a atividade hidrolítica acompanhada a cada 7 dias. A Figura 19 mostra os resultados obtidos.

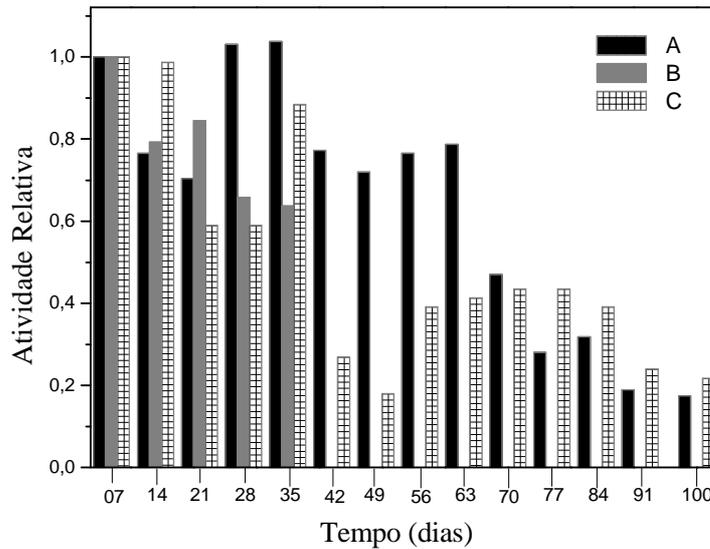


Figura 19-Estabilidade à estocagem sob refrigeração (10°C) de lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em organo-géis de (A) Alginato/SDS/Heptano, (B) Gelatina/SDS/Hexano e (C) Quitosana/SDS/Heptano.

De acordo com os resultados, pode-se avaliar que a metodologia de imobilização para lipases de *Rhizomucor miehei* em organo-géis a base de gelatina e quitosana promovem uma estabilidade sob 10°C, permitindo sua atividade por até 40 dias, após esse período o organo-gel a base de quitosana teve um decréscimo em sua atividade. O organo-gel a base de gelatina não apresentou estabilidade físico-química e houve perda de massa ao longo do tempo, ocasionado talvez pela quebra de uma possível emulsão. A metodologia de imobilização utilizando organo-géis a base de alginato promoveram uma estabilidade maior em relação aos outros derivados, em torno de 60 dias, tendo um decréscimo após esse período.

5. Conclusões

Neste estudo foram avaliadas metodologias de imobilização de lipases de *Rhizomucor miehei* em organo-géis a base de polímeros como gelatina, alginato e quitosana, utilizando como fases orgânicas hexano ou heptano, na presença de tensoativos como dodecilsulfato de sódio (SDS) ou brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTABr). Estudaram-se os melhores biocatalisadores obtidos, visando à aplicação em síntese de ésteres etílicos a partir de reações de esterificação de matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos livres.

Os estudos realizados nesta dissertação contribuíram para o desenvolvimento e aplicação de biocatalisadores de baixo custo, levando em consideração a matriz do suporte e permitindo o seu uso em síntese orgânica.

Foi avaliada a estabilidade térmica como uma estratégia para escolha dos melhores derivados, observou-se que os derivados que obtiveram melhor desempenho foram Gel/SDS/Hex que apresentou eficiência de 4,1%, tempo de meia-vida de 12,7 minutos e 30 vezes mais estável que a enzima na sua forma livre, Alg/SDS/Hep apresentou eficiência 6,0%, tempo de meia-vida 0,5 minutos e 1,3 vezes mais estável, Qui/SDS/Hep apresentou eficiência 1,0%, tempo de meia-vida 1,0% e 2,3 vezes mais estável.

A metodologia de imobilização seguida de ativação por glutaraldeído 2% (v/v), apesar de apresentar bons resultados de rendimento, tempo de meia-vida e fator de estabilidade, não apresentou boa atividade do derivado e eficiência causada pela redução dos poros após reticulação, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo. O uso do brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTABr) não apresentou bons resultados, devido inativação da enzima causado pelo tensoativo.

Os estudos para investigar a carga máxima de enzima que pode ser imobilizada por massa de suporte foram realizados nas temperaturas de 15°C e 25°C, observou-se que para os três derivados selecionados as melhores eficiências foram obtidas utilizando carga de 50U.g⁻¹, tendo um decréscimo a medida que a carga enzimática aumenta, comprovando que com o aumento da carga enzimática há redução da difusividade do substrato nos poros do gel, reduzindo a eficiência. Notou-se também que a variação na temperatura não acarretou mudanças significativas nos valores de eficiência, não apresentando efeitos difusionais.

Na esterificação do ácido oleico o derivado Qui/SDS/Hep apresentou o melhor resultado com 80,0% de conversão na razão molar ácido/álcool 1:1, seguido de Gel/SDS/Hex com 72,9% e Alg/SDS/Hep com 16,9% de conversão na razão molar ácido/álcool 1:10. A utilização da zeólita foi favorável para o derivado Gel/SDS/Hex nas razões de 1:1 e 1:5, onde

5. Conclusões.....Cavalcante, K.F.

a conversão aumentou de 21,6 % para 79,0% e de 56,0% para 79,0%, respectivamente. A adição de zeólitas não apresentou bons resultados para os demais derivados, acarretando em um decréscimo da conversão.

O derivado Alg/SDS/Hep apresentou boa estabilidade a estocagem sob 10°C por um período de 60 dias, tendo um decréscimo ao longo do tempo. Os derivados Gel/SDS/Hex e Qui/SDS/Hep apresentaram estabilidade por 40 dias, após este período também observou-se redução das atividades. O derivado produzido à base de gelatina não apresentou estabilidade físico-química, acarretando em uma perda de massa ao longo do tempo.

Desta forma, esta dissertação mostra que a aplicação derivados de lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em organo-géis é viável e promissora, uma vez que obtiveram-se ótimas conversões nas reações de esterificação de matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos livres. O uso de sistemas de organo-géis evita uma possível desnaturação das enzimas ao serem utilizadas em solventes orgânicos, portanto, esses sistemas tornam-se uma nova alternativa para imobilização de enzimas.

6. *Sugestões para trabalhos futuros*Cavalcante, K.F.

6. Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar outras metodologias de ativação, como por exemplo, por epícloridrina e glicidol;
- Realizar ensaios de estabilidade operacional;
- Avaliação dos parâmetros cinéticos k_m e $V_{máx}$ para os melhores biocatalisadores;
- Realizar ensaios de caracterização dos suportes;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H, HIOL, A., DEYRIS, V., COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n.7, p.968-975.2002.

ADRIANO, W. S.; FILHO, E. H. C.; SILVA, J. A.; GONÇALVES, L. R. B. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.22, p.529-538. 2005.

ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E.; GIORDANO, R. L. C. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2170-2179, 2008.

ADRIANO, W. S. **Preparação e Caracterização de Derivados de Enzimas Industriais em Quitosana**. 2008. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

AGUIAR, R.O.; MONDARDO, R.M.; AGNES, E. J.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E.B. Avaliação e Comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, p. 15-19, 2010.

ALONSO, N. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sepharose supports by the glutaraldehyde crosslinking method. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 35, p. 57-61, 2005.

ANTCZAC, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAC, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis- key factors affecting of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185- 1194, 2009.

ARAÚJO, L. T.C. **Aplicações de lipases**. 2009. 64f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)- Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

BARON, A. M. **Preparação e Caracterização de Lipases Imobilizadas para Utilização em Biocatálise**. 2008. 138 f. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BEN-SALAH, R., GHAMGHUI, H., MILED, N., MEJDOUB, H., GARGOURI, Y. Production of Butyl Acetate Ester by Lipase from Novel Strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n.4, p.368-372, 2007.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BEZERRA, C. S. **Imobilização de β - galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em Diferentes Suportes de Ativação.** 2012. 111 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

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.

BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S., DODSON, E., DODSON, G.G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J. P., CHRISTIANSEN, L., HUGJENSEN, B., NORSKOV, L., THIM, L., MENGUE, U., A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v.343, p.767-770, 1990.

BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z. S., DODSON, G.G., LAWSON, D. M., TURKENBURG, J. P., BJORKLING, F., HUGJENSEN, B., PATKAR, S. A., THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v.351, p.491-494, 1991.

CARNEIRO, E. A. **Preparação de Catalisadores Visando à Obtenção de Biodiesel Por Esterificação Enzimática de Ácidos Graxos de Óleo de Coco.** 2013. 116 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

CARVALHO, N. B. **Produção De Ésteres Etilicos E Emulsificantes Utilizando Lipase Imobilizada Em Matrizes Hidrofóbicas.** 2011. 104 F. Dissertação (Mestrado Em Engenharia de Processos), Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, 2011.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; D'ADDIO NOFFS, M.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26(1), p.75- 80, 2003.

CASTRO, H.F.; MENDES, A A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação, **Química Nova**, v. 27, no. 1, p. 146-156, 2004.

CENI, G.; LERIN, L.A; de CONTO, J.F; BRANCHER, C.V; da SILVA, P.C; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; de OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V; OSTREICHERO, E.G; ANTUNES, O.A.C. Optimization of 1-glycerol benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents. **Enzyme Microbial Technology**, v. 46, p.107-112, 2010.

CHEN, P.; CHEN, M.; FENG-HUEI LIN, F.; SU, W. Release characteristics and bioactivity of gelatin-tricalcium phosphate membranes covalently immobilized with nerve growth factors. **Biomaterials**, v. 26, p. 6579–6587, 2005.

CHIBATA, I. Immobilized enzymes-Research and development. **New York: John Wiley & Sons**, 284 p., 1978.

CUMANA, S., SIMONS, J., LIESE, A., HILTERHAUS, L., SMIRNOVA, I. Immobilization of glucose 6-phosphate dehydrogenase in silica-based hydrogels: A comparative study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85– 86, p. 220– 228, 2013.

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

DELIMITSOU, C.; ZOUMPANIOTI, M.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H. Activity and stability studies of *Mucor miehei* lipase immobilized in novel microemulsion-based organogels. **Biocatal. Biotransform.**; v. 20; p. 319–27, 2002.

DUBAL, S.A., TILKARI, Y.P., MOMIN, S.A., BORKAR, I.V. Biotechnological Routes in Flavor Industries. **Advanced Biotech.**, March , p-20-29, 2008.

EL-GHAFFAR, M.A.A.; HASHEM, M.S. Calcium alginate beads encapsulated PMMA-g-CS nano-particles for α -chymotrypsin immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 2095–2102, 2013.

FADNAVIS, N.W.; KOTESHWAR, K. An unusual reversible sol–gel transition phenomenon in organogels and its application for enzyme immobilization in gelatin membranes. **Biotechnol. Prog.**; v. 15; p. 98-104, 1999.

FOLMER, B.; HOLMBERG, K.; SVENSSON, M. Interaction of *Rhizomucor miehei* Lipase with an Amphoteric Surfactant at Different pH Values. **Langmuir**, v.13, p. 5864-5869, 1997.

FORESTI, M.L.; PEDERNERA, M.; BUCALÁ, V.; FERREIRA, M.L. Multiple Effects of Water on Solvent-free Enzymatic Esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 62-70, 2007.

GARCÍA, R.; GARCÍA, T.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Kinetic modelling of the synthesis of 2-hydroxy-5-hexenyl 2-chlorobutyrate ester by an immobilised lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 185–190, 2000 (b).

GARCÍA, T.; COTERON, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst. **Chemical Engineering Science**, v. 55; p. 1411-1423, 2000 (a).

GOMES, L. F. S.; SOUZA, S. N. M.; BARICCATTI, R. A. Biodiesel Produzido com Óleo de Frango. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 1, p. 57-62, 2008.

GUISÁN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cell**. 2 ed. Totowa: Humana Press. Cap 1, p. 6-14, 2006.

GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 12, p. 1535-1549, 1999.

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

HIRANO, S. Chitin Biotechnology application. **Biotechnology Annual Review**, v. 2, p. 237-258, 1996.

Referências BibliográficasCavalcante, K.F.

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

JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G. Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 20, p. 664-672, 1997.

JIANG, Y., LU, J., SUN, K., MA, L., DING, J. Esterification of oleic acid with ethanol catalyzed by sulfonated cation exchange resin: Experimental and kinetic studies. **Energy Conversion and Management**, v. 76, p. 980–985, 2013.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 457–470, 2008.

KNEZEVIC, Z.; BOBIC, S.; MILUTINOVIC, A.; OBRADOVIC, B.; MOJOVIC, L.; BAGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry**, v. 38; n. 3; p. 313-318, 2002.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.126-139. 2004.

LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K., VERGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 30, p.81-87, 1987.

LEINO, H.; KOSOUROV, S.N.; SAARI, L.; SIVONEN, K.; TSYGANKOV, A.A. ; ARO, E.; ALLAHVERDIYEVA, Y. Extended H₂ photoproduction by N₂-fixing cyanobacteria immobilized in thin alginate films. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p.151-161, 2012.

LIU, H., CUI, Y., LI, P., ZHOU, Y., CHEN, Y., TANG, Y., LU, T. Polyphosphonate induced coacervation of chitosan: Encapsulation of proteins/enzymes and their biosensing. **Analytica Chimica Acta**, v. 776, p. 24– 30, 2013.

LUCENA, I. L. **Otimização do Processo de Obtenção de Biodiesel Através da Adsorção de água Formada Durante a Reação de Esterificação**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2008.

MAHAPATRA, P., KUMARI, A., GARLAPATI, V.J., BANERJEE, R., NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **J Mol Catal B: Enzymatic**, v.60, p.230–239, 2009.

MARCHETTI, J.M; MIGUEL, V.U; ERRAZO, A.F. Possible methods of biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11; p. 1300-1311, 2007.

MARTINS, A.B., GRAEBIN, N.G., LORENZONI, A.S.G., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., AYUB, M.A.Z., RODRIGUES, R.C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, p.2311–2316, 2011.

MENDES, A. A.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R. L.C. Triagem de Suportes Orgânicos e Protocolos de Ativação na Imobilização e Estabilização de Lipase de *Thermomyces Lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. ; CATROA, H.F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**. v. 34, n. 5, p. 831- 840, 2011 a.

MENDES, A.A. **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para Síntese Enzimática de Biodiesel**. 2009. 194 f. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MICHAUX,F.; ZOUMPANIOTI, M.; PAPAMENTZELOPOULOU, M.; STÉBÉ,M. J.; BLIN, J. L.; XENAKIS, A. Immobilization and activity of *Rhizomucor miehei* lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants. **Process Biochemistry**; v. 45; p. 39–46, 2010.

MORETO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**, São Paulo: Editora Varela, p. 114-133, 1998. 1ª Ed.

MUSSATTO, S.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, v. 242, p. 28, 2007.

NORIN, M., HAEFFNER, F., ACHOUR, A., NORIN, T., HULT, K. Computer modelling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* and *Candida rugosa*. **Protein Sci.**, v.3, p.1493-1503,1994.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; FACCIO, C.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C. Influência das Variáveis de Processo na Alcoólise Enzimática de Óleo de Mamona, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 178-182, 2004.

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, n. 5, p. 632- 636, 2000.

OLIVEIRA, U.M.F. **Síntese de Ésteres de Interesse Comercial Utilizando Lipases Imobilizadas em Quitosana**. 2012. 191 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Rede Nordeste de Biotecnologia- RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

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.

PAIVA, A. L; MALCATA, F. X. Integration of reaction and separation with lipases: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**,v. 3, p. 99-109, 1997.

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

RADZI, S. M., MUSTAFA, W.A.F., OTHMAN, S.S., NOOR, H.M. Green Synthesis of Butyl Acetate, A Pineapple Flavour via Lipase-Catalyzed Reaction. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 59, p. 677-680, 2011.

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

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.

RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an Industrial Biocatalyst in Chemical Process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.64, p. 1-22, 2010.

ROSSI, C. G. F. T., DANTAS, T. N. C., NETO, A. A. D., MACIEL, M. A. M. Microemulsões: Uma abordagem básica e Perspectiva para Aplicabilidade Industrial. **Rev. Univ. Rural. Sér. Ci. Exatas e da Terra**, Seropédica, RJ, EDUR, vol. 26, n. 1-2, jan-dez, p. 45-66, 2007.

SADANA, A., HENLEY, J.P. Analysis of enzyme deactivations by a series-type mechanism: influence of modification on the activity and stability of enzymes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 501, p.73–79, 1987.

SALUM, T. F. C. S. **Produção e Imobilização de Lipase de *Burkholderia cepacia* Iteb11 para a Síntese de Ésteres Étílicos**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SAMUKAWA, T., KAIEDA, M., MATSUMOTO, T., BAN, K., KONDO, A., SHIMADA, Y., NODA, H., FUKUDA, H. Pretreatment of Immobilized *Candida Antarctica* Lipase for Biodiesel Production from Plant Oil, **Journal of Biocience and Bioengineering**, v. 90, p. 180-183, 2000.

SANTOS, J. C. S. **Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SAXENA R.K.; SHEORAN A.; GIRI B.; DAVIDSON W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 18, 2003.

SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDLÉ, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E.E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microsp. Mesop. Mat.**, v. 109, p. 350- 361, 2008.

SERRA, S., FUGANTI, C., BRENNER E. Biocatalytic Preparation of natural flavours and fragrances. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n.4, 2005.

Referências BibliográficasCavalcante, K.F.

SILVA, J.A.; MACEDO, G.P.; RODRIGUES, D.S.; GIORDANO, R.L.C.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v.60, p.16– 24,2012.

SOUZA, M.C.M. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo B em Nanopartículas Magnéticas Visando a Aplicação na Síntese de Ésteres**. 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

STERGIOU, P. Y., FOUKIS, A., FILIPPOU, M., KOUKOURITAKI, M., PARAPOULI, M., THEODOROU, L.G., HATZILOUKAS, E., AFENDRA, A., PANDEY,A., PAPAMICHAEL, E.M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846–1859,2013.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, V. A.Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. C. **Enzimas com agentes biotecnológicos**. Ed. Legis Summa, Cap. 4, 35-85, 2004.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the Operating Conditions and the External Mass Transfer Limitations on the Synthesis of Fatty Acid Esters Using a *Candida antarctica* Lipase, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 716-722, 2007.

VASCONCELOS, A. **Sínteses e Caracterização de Novos Catalisadores Zeolíticos e sua Utilização como Suportes Inorgânicos para Imobilização de Lipase Produzida por *Rhizomucor miehei* e seu Estudo Catalítico na Reação de Transesterificação do Óleo de Soja para a Produção de Biodiesel**. 2010. 126 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

VIEIRA, D.C. **Imobilização da Enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em Agarose e Quitosana Utilizando Diferentes Protocolos de Ativação**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**,v. 25, p. 515-536, 2007.

VOLPATO, G. **Produção, Purificação e Imobilização de Lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 Produzidas em Glicerol**. 2009. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

WANG, J.; HUANG, Q.; HUANG, F.; WANG, J.; HUANG, Q. Lipase-catalyzed Production of Biodiesel from High Acid Value Waste Oil Using Ultrasonic Assistant, **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 1121-1128, 2007.

Referências BibliográficasCavalcante, K.F.

YADAV, G.D.; TRIVEDI A.H. Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 783–789, 2003.

YADAV, R. R.; MUDLIAR, S.N.; SHEKH, A.Y.; FULKE, A.B.; DEVI, S.S.; KRISHNAMURTHI, K.; JUWARKAR, A.; CHAKRABARTI, T. Immobilization of carbonic anhydrase in alginate and its influence on transformation of CO₂ to calcite. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 585-590, 2012.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. **Enzyme Microbiology Technology**, v.23, p. 438-450, 1998.

YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal Stable and short-chain alcohol tolerant lipase of *Burkholderia cepacia* strain G63. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 91-96, 2007.

ZAID, A., GAINER, J.L., CARTA, G., MRANI, A., KADIRI, T., BELARBY, Y. Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipases in n-hexane: kinetic parameters and chain-length effects. **Journal of Biotechnology**, v.93, p. 209-216, 2002.

ZHANG, W.; WANG, N.; ZHOU, Y.; HE, T.; YU, X. Enhancement of activity and stability of lipase by microemulsion-based organogels (MBGs) immobilization and application for synthesis of arylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p 65–71, 2012.

ZOUMPANIOTI, M.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Microemulsion-based organ gels as matrices for lipase immobilization. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 395–406, 2010.

ANEXOS

ANEXO A - Perfis de inativação térmica a 60 °C da lipase de *Rhizomucor miehei* na forma solúvel e imobilizada em diferentes suportes

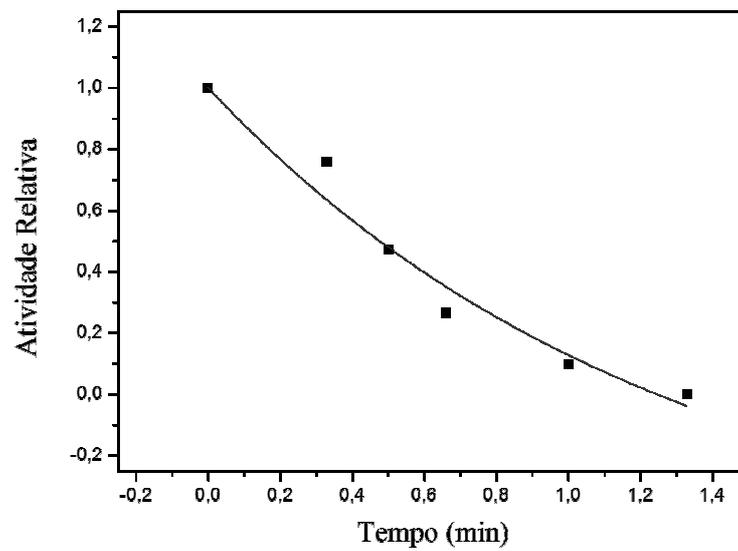
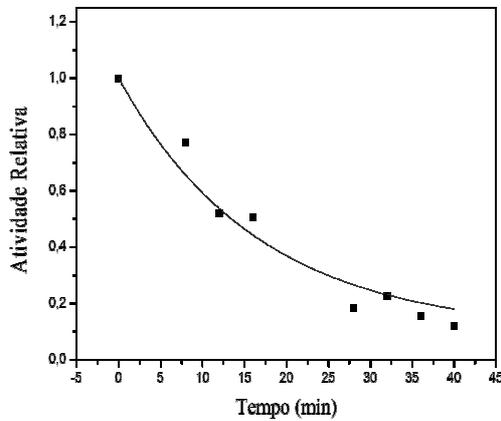
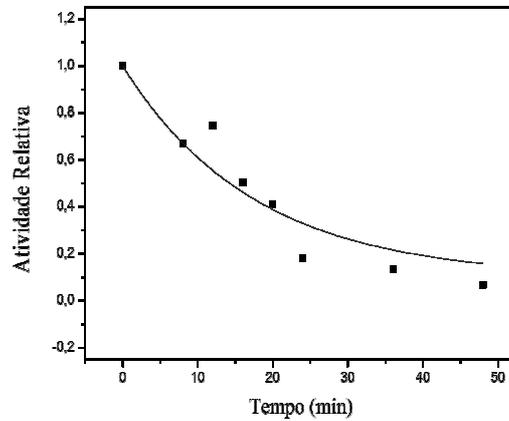


Figura A1- Perfil de inativação térmica a 60 °C da lipase de *Rhizomucor miehei* na forma solúvel. As linhas indicam ajuste do modelo de decaimento exponencial de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

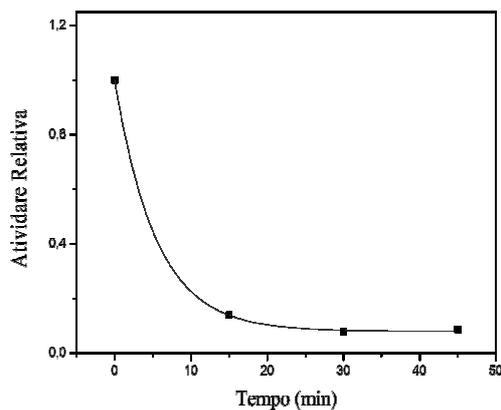


(a)

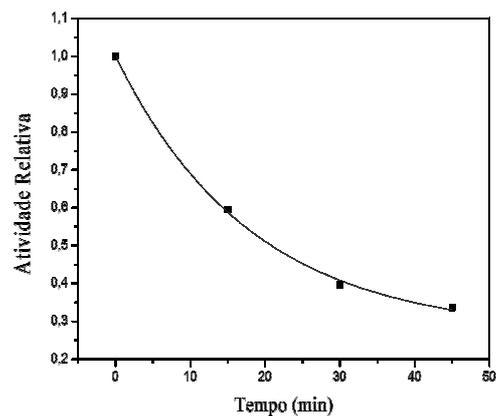


(b)

Figura A2- Perfil de inativação térmica a 60 °C da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em (a) Gel/SDS/Hexano e (b) Gelatina/SDS/Heptano. As linhas indicam ajuste do modelo de decaimento exponencial de Sadana-Henley aos pontos experimentais



(a)



(b)

Figura A3- Perfil de inativação térmica a 60 °C da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em (a) Gel/SDS/Hexano e (b) Gelatina/SDS/Heptano ativados com glutaraldeído 2% (v/v). As linhas indicam ajuste do modelo de decaimento exponencial de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

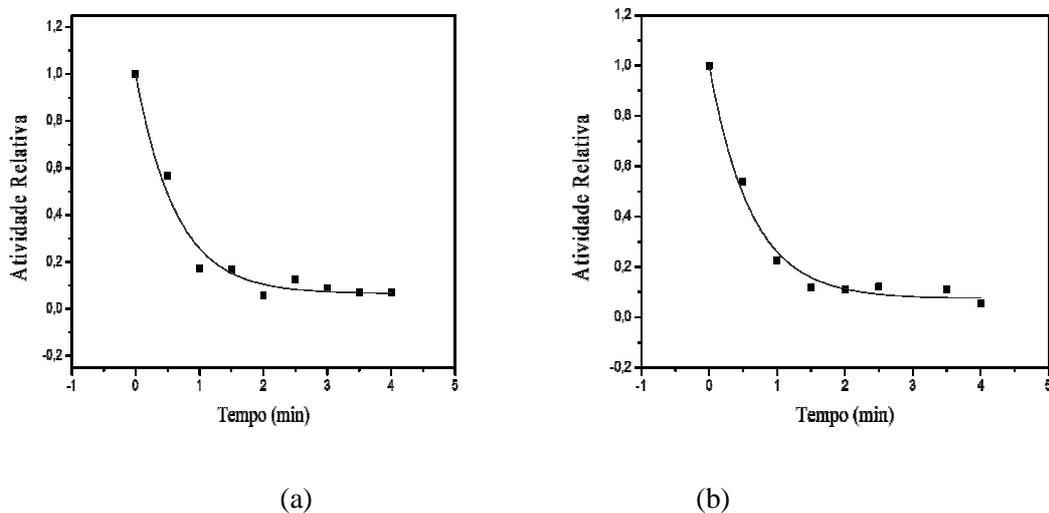


Figura A4- Perfil de inativação térmica a 60 °C da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em (a) Alginato/SDS/Hexano e (b) Alginato/SDS/Heptano. As linhas indicam ajuste do modelo de decaimento exponencial de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

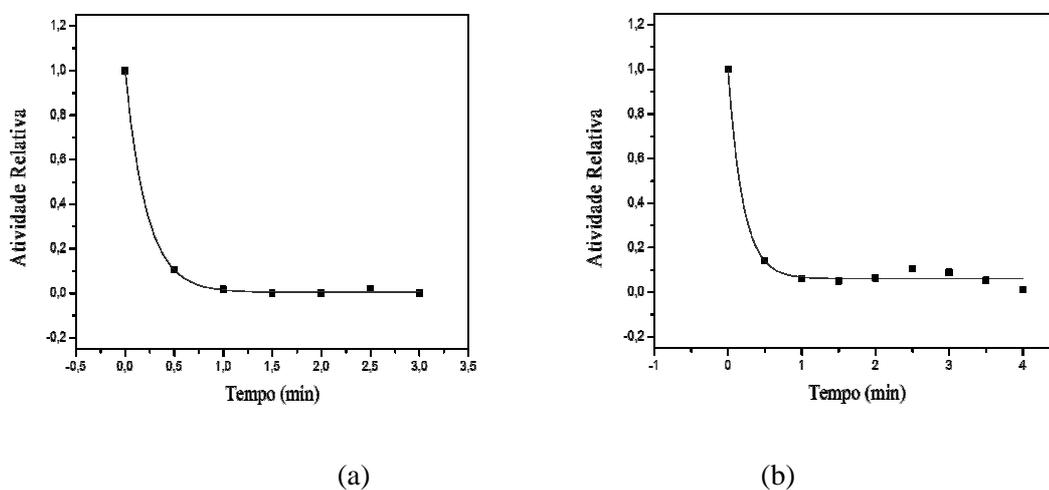


Figura A5- Perfil de inativação térmica a 60 °C da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em (a) Gel/SDS/Hexano e (b) Gelatina/SDS/Heptano ativados com glutaraldeído 2% (v/v). As linhas indicam ajuste do modelo de decaimento exponencial de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

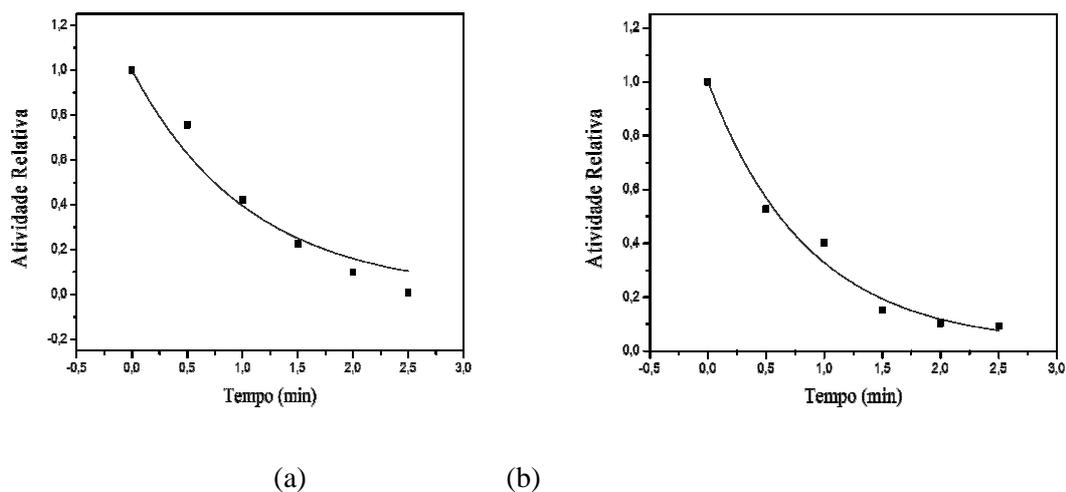


Figura A6- Perfil de inativação térmica a 60 °C da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em (a) Qitosana/SDS/Hexano e (b) Qitosana/SDS/Heptano. As linhas indicam ajuste do modelo de decaimento exponencial de Sadana-Henley aos pontos experimentais.