



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

MAÍSA PESSOA PINHEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS PELA
ESTABILIZAÇÃO DE LECITASE ULTRA EM SUPORTE MACROPOROSO**

FORTALEZA

2018

MAÍSA PESSOA PINHEIRO

DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS PELA
ESTABILIZAÇÃO DE LECITASE ULTRA EM SUPORTE MACROPOROSO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.
Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Coorientadora: Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FOTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P721d Pinheiro, Máisa Pessoa.
Desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos pela estabilização de lecitase ultra em suporte macroporoso / Máisa Pessoa Pinheiro. – 2018.
93 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.
Coorientação: Prof. Dr. Luciana Roocha Barros Gonçalves.
1. Biocatalisadores.. 2. Lecitase Ultra. 3. Suportes modificados. 4. Estabilidade. I. Título.

CDD 660

MAÍSA PESSOA PINHEIRO

DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS PELA
ESTABILIZAÇÃO DE LECITASE ULTRA EM SUPORTE MACROPOROSO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química 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: 28/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof.^a Dr.^a Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Maria Cristiane Martins de Souza
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof.^a Dr.^a Maria Valderez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, eu agradeço infinitamente, pelo amor, confiança e esforço que foi constantemente concedido a mim e a minha irmã. Por não medirem esforços para oferecer a melhor educação que eu podia ter, por me ensinarem sempre a seguir o caminho da retidão e pelo apoio incessante em todas as etapas e decisões da minha vida.

À minha irmã, Beatriz, que, ao seu modo, sempre acreditou e se orgulhou de mim. Por sempre estar presente em momentos importantes da minha vida e pela companhia diária.

Ao meu orientador, Professor José Cleiton Sousa dos Santos, por toda dedicação e disponibilidade para com a minha orientação. Por me incentivar e acreditar no meu potencial como pesquisadora, por todos os conhecimentos transmitidos, que, certamente, fizeram de uma aluna mais experiente e competente e por sempre prezar pela excelência na rotina acadêmica.

À minha, também, orientadora, Professora Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela serenidade, respeito e integridade na maneira como trata os seus alunos. Por ser uma mulher forte, inteligente e competente, que transmite admiração aos que estão ao seu redor. Agradeço também por ter me acolhido no GPBio e por me proporcionar muito aprendizado ao longo desses anos.

A todos os professores que me proporcionaram conhecimento, valores e admiração durante toda minha vida estudantil.

A todos os membros do GPBio que, durante esses dois anos, foram ótimos companheiros de trabalho, por serem sempre tão prestativos e solícitos e por tornarem a rotina do laboratório descontraída e agradável. Agradeço, em especial, aos meus queridos amigos de laboratório, Bruna, Eva, Guilherme, Kimberle, Magno, Nathália e Rayanne, pela inestimável companhia e pelos preciosos momentos compartilhados.

Ao meu grande amigo, Eder, por estar presente em minha vida desde à infância, por sempre me aconselhar e incentivar a buscar novos desafios e pela preciosa amizade de longas datas.

Ao meu querido amigo e namorado, Daniel, pelo companheirismo e apoio diário, por todo cuidado e atenção que são gratuitamente dedicados a mim e por tornar a minha vida mais leve e feliz, mesmo a milhas de distância.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

RESUMO

A proposta desse trabalho foi imobilizar a Lecitase Ultra® (LU) no suporte Immobead-350 (IB- 350) através de diferentes protocolos de imobilização, utilizando o suporte sem modificação e o suporte modificado (ativado com grupos funcionais por diversas estratégias) e, também, através da imobilização por *cross-linking*. Os diferentes protocolos foram executados com o intuito de modular as propriedades da enzima e avaliar o efeito que o tempo de incubação, a utilização de diferentes pHs na ionização dos grupos funcionais da enzima e do suporte, assim como a etapa de bloqueio, podem exercer na conformação final da enzima e nas propriedades dos biocatalisadores. Além disso, avaliou-se a versatilidade dos biocatalisadores imobilizados em suportes ativado com grupos epóxi, aldeído, divinilsulfona e glutaraldeído. Os resultados obtidos mostraram que todos os biocatalisadores produzidos foram ativos frente à hidrólise do *p*-nitrofenolbutirato (*p*-NPB), porém Leci-GLU apresentou a maior atividade do derivado (17,39 U/g) e foi a preparação mais estável na temperatura de 50 °C (1,9 h) e na presença de acetonitrila-30 % (42,6 h). Os derivados também foram testados quanto à estabilidade operacional e de estocagem. Nesse primeiro ensaio, os biocatalisadores mantiveram 100 % da sua atividade inicial durante 10 ciclos reacionais consecutivos, enquanto na estabilidade de estocagem, todos os derivados permaneceram com 80 % da atividade inicial em 30 dias de armazenamento a 4°C, exceto Leci-DVS que reduziu cerca de 50 % da sua atividade inicial. Para testar a versatilidade dos biocatalisadores, eles foram aplicados em reações de hidrólise (substrato mandelato de metila) e transesterificação (acetilação do álcool benzílico). O produto obtido dessa última reação é conhecido como aroma de jasmim e possui alto valor comercial, podendo ser utilizado na indústria de detergentes e perfumaria. Para esses ensaios, a hidrólise do mandelato de metila foi testada em diferentes pHs (5, 7 e 9) e a maior atividade foi obtida com o derivado Leci-crossA a pH 7 (28,4 U/mg), enquanto na acetilação do álcool benzílico o biocatalisador com maior atividade foi Leci-GLU (2,1 mg).

Palavras-chave: Biocatalisadores, Lecitase Ultra, suportes modificados e estabilidade.

ABSTRACT

The aim of this work was to immobilize Lecitase Ultra® (LU) onto Immobead-350 (IB-350) support through different immobilization protocols, using unmodified support and modified support (activated with functional groups by several strategies) and also through immobilization by cross-linking. The different immobilization strategies in this work were carried out in order to modulate enzyme properties and to evaluate the effects of three parameters in the final enzyme conformation and biocatalyst properties: incubation time; different pH values in the ionization of functional groups of the enzyme and of the support; and blocking stage. In addition, biocatalysts formed by immobilization of LU onto supports activated with aldehyde, divinylsulfone or glutaraldehyde groups were evaluated for their catalytic versatility versus two different substrates. The results showed that all biocatalysts were active versus the hydrolysis of *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB), but Leci-GLU showed the highest derivative activity (17.39 U / g) and was the most stable preparation both at 50 °C (1.9 h) and in the presence of 30% acetonitrile (42.6 h). The derivatives were also tested for operational and storage stability. In this first assay, the biocatalysts maintained 100 % of their initial activity during 10 consecutive reaction cycles, while in storage stability all the derivatives remained with 80 % of the initial activity in 30 days of storage at 4 °C, only Leci-DVS reduced about 50 % of its initial activity. In order to test catalytic versatility, biocatalysts were applied in hydrolysis (methyl mandelate substrate) and transesterification (acetylation of benzyl alcohol) reactions. The product obtained from this last reaction is known as jasmine aroma and has high commercial value, in addition, it can be used in detergent and perfume industry. In relation to methyl mandelate hydrolysis, the biocatalysts were tested at different reaction conditions (pHs 5, 7 and 9) and the highest activity was obtained with the Leci-crossA derivative at pH 7 (28.4 U / mg). In benzyl alcohol acetylation the biocatalyst with the highest activity was Leci-GLU (2.1 mg).

Keywords: Biocatalysts, Lecitase Ultra, modified supports and stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reações catalisadas por lipases.....	21
Figura 2 -	Ativação interfacial das lipases em suporte hidrofóbico.....	22
Figura 3 -	Modo de ação das fosfolipases. Uma descrição generalizada de um fosfolípido, onde X pode ser H, colina, etanolamina, inositol, etc. Os vários locais de ataque para a clivagem hidrolítica dos vários tipos de fosfolipase FLA1, FLA2, FLC e FLD são mostrados com setas.....	23
Figura 4 -	Principais estratégias para imobilização de enzimas.....	27
Figura 5 -	Método de imobilização entre o suporte-epóxi-ativado e a enzima.....	30
Figura 6 -	Diferenças na difusão do substrato em suportes com pequeno e grande tamanho de poro.....	31
Figura 7 -	Microscopia Eletrônica de Varredura do suporte IB-350 (20 kV). (A): Suporte IB-350 (x 101); (B): Imagem aproximada de uma esfera do suporte (x 300); (C): Superfície do suporte sem enzima (x 2000); (D): Superfície do suporte com a enzima imobilizada (x 2000)	43
Figura 8 -	Isoterma de adsorção-dessorção do N ₂ para o suporte Immobead-350. (■): adsorção, (■): dessorção.....	44
Figura 9 -	Efeito do pH no curso de imobilização da Lecitase em Immobead-350, a 25 °C. Círculo vermelho: remanescente – tampão fosfato, pH 7 (25 mM), quadrado preto: remanescente – tampão bicarbonato, pH 10 (25 mM).....	48
Figura 10 -	Gráfico de carga de proteína oferecida (mg/g de suporte) versus Atividade Teórica (U/g). As cargas oferecidas variaram de 100 a 300 mg de proteína /g de suporte. A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM)	50
Figura 11 -	Gráfico de carga de proteína oferecida (mg/g de suporte) versus Atividade do derivado (U/g). As cargas oferecidas variaram de 100 a 300 mg de proteína /g de suporte. A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM)	51
Figura 12 -	Análise de SDS-PAGE. Os experimentos foram realizados como descrito na Secção 4.2.8.8. Faixa 1: marcador de baixo peso molecular, Faixa 3: enzima livre, Faixa 4: derivado – 1 hora de incubação, pH 10, Faixa 5: derivado – 8 horas de incubação, Faixa 6: derivado – 16 horas de incubação, Faixa 7: derivado – 24 horas de incubação, Faixa 8 – imobilização direto a pH 10, Faixa 9: imobilização direto a pH 7, Faixa 10: marcador de baixo peso molecular. Edição feita pelo programa Gel Analyzer.....	52

Figura 13 -	Modificação química dos grupos epóxi presentes no suporte IB-350 e formação de grupos aldeído.....	62
Figura 14 -	Representação esquemática da ativação do suporte IB-350-Aldeído com EDA, seguido da adição de grupos gluutaraldeído ou divinilsulsona.....	63
Figura 15 -	Representação esquemática da hidrólise do mandelato de metila.....	68
Figura 16 -	Representação esquemática da reação de transesterificação do álcool benzílico usando acetato de vinila como doador acil.....	68
Figura 17 -	Espectro de FTIR do suporte IB-350 com e sem modificações, antes (A) e após (B) a imobilização. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.....	69
Figura 18 -	Curso de imobilização da Lecitase em diferentes preparações do suporte Immobead-350. (■): Leci-GLU (pH = 7,0 – 25 mM); (■): Leci-DVS (pH = 10,0 – 25 mM); (■): Leci-adsE (pH = 7,0 – 25 mM); (■): Leci-adsA (pH = 7,0 – 25 mM). A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM). As linhas representam a tendência dos dados. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.....	71
Figura 19 -	Estabilidade operacional dos derivados (■): Leci-GLU, (■): Leci-crossE e (■): Leci-crossA, (■): Leci-DVS, (■): Leci-adsE, (■): Leci-adsA e (■): Leci-2pE. A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM). Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.....	76
Figura 20 -	Estabilidade de estocagem dos derivados (■): Leci-GLU, (■): Leci-DVS, (■): Leci-2pE, (■): Leci-adsE, (■): Leci-adsA, (■): Leci-crossE e (■): Leci-crossA, armazenados à 4 °C. A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM). As linhas representam a tendência dos dados. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.....	77
Figura 21 -	Análise de SDS-PAGE. Os experimentos foram realizados como descrito na Secção 2.3.9. Faixa 1: marcador de baixo peso molecular, Faixa 3: enzima livre, Faixa 4: Leci-DVS, Faixa 5: Leci-GLU, Faixa 6: Leci-crossE, Faixa 7: Leci-crossA, Faixa 8: Leci-2pE, Faixa 9: Leci-adsE, Faixa 10: Leci-adsA. Edição feita pelo programa Gel Analyzer. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferentes métodos de imobilização e aplicações da Lecitase® Ultra em diversas reações de interesse industrial.....	25
Tabela 2 -	Parâmetros de imobilização da Lecitase imobilizada em diferentes pHs (7 e 10 – 25 mM) no suporte Immobead-350, 25 °C, por 24 horas.....	47
Tabela 3 -	Parâmetros de imobilização da Lecitase no suporte IB-350, na ausência e presença de detergente. Imobilização em tampão bicarbonato pH 10,0 (25 mM), 25 °C.....	48
Tabela 4 -	Tempos de meia-vida em diferentes condições (expresso em minutos) da Lecitase imobilizada em IB-350, sob diferentes condições de inativação. A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM). Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.....	53
Tabela 5 -	Conteúdo de elementos (C, H, N e S) do suporte e biocatalisadores por análise elementar. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.....	70
Tabela 6 -	Parâmetros de imobilização da Lecitase imobilizada em diferentes preparações do suporte Immobead-350. Atividade medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM). Carga de imobilização: 50 mg/g de suporte. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos....	72
Tabela 7 -	Tempos de meia-vida dos biocatalisadores produzidos em variados protocolos de imobilização, sob diferentes condições de inativação. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.....	74
Tabela 8 -	Atividade de diferentes preparações de Lecitase versus diferentes substratos. MM: Mandelato de Metila. Atividade está representada em U/mg. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.....	80
Tabela 9 -	Valores de CMC do Triton X-100 e SDS.....	93
Tabela 10 -	Dados da análise de eletroforese, com peso molecular (MW) de cada banda identificada no gel. Dados obtidos pelo Gel Analyzer – Resultados 1.....	93
Tabela 11 -	Dados da análise de eletroforese, com peso molecular (MW) de cada banda identificada no gel. Dados obtidos pelo Gel Analyzer – Resultados 2.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_{td}	Atividade do derivado
Ar	Atividade Relativa, %
A_{ti}	Atividade inicial (oferecida), U.g ⁻¹
At	Atividade Hidrolítica, U.g ⁻¹
Att	Atividade Teórica, U.g ⁻¹
B	Bradford, mg.mL ⁻¹
BET	Método Brunauer, Eemmett e Teller
C_o	Carga oferecida, mg P. g ⁻¹ suporte
D_p	Diâmetro médio de poros
DVS	Divinilsulfona
EDA	Etilenodiamina
f	Fator da curva de calibração do pnp ($\mu\text{mol}/(\text{mLabs})$)
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho
GLU	Glutaraldeído
IB-350	Immobead-350
Leci-2p	Lecitase imobilizada em IB-350 ativado com grupos epóxi através de dois passos de imobilização;
Leci-Ads	Lecitase imobilizada em IB-350 através da estratégia de adsorção física;
Leci-adsA	Lecitase imobilizada no suporte IB-350 (ativado com grupos aldeído) através da estratégia de adsorção física;
Leci-adsE	Lecitase imobilizada no suporte IB-350 (ativado com grupos epóxi) através da estratégia de adsorção física;
Leci-crossA	Lecitase imobilizada no suporte IB-350 (ativado com grupos aldeído) através da estratégia de adsorção física, seguida de reticulação (<i>cross-linking</i>) com glutaraldeído;
Leci-crossE	Lecitase imobilizada no suporte IB-350 (ativado com grupos epóxi) através da estratégia de adsorção física, seguida de reticulação (<i>cross-linking</i>) com glutaraldeído;
Leci-CVL	Lecitase imobilizada em IB-350 ativado com grupos epóxi, através da estratégia de ligação covalente multipontual;

Leci-DVS	Lecitase immobilizada no suporte IB-350 ativado com grupos divinilsulfona;
Leci-GLU	Lecitase immobilizada no suporte IB-350 ativado com grupos glutaraldeído;
LU	Lecitase Ultra
Mb	Massa do biocatalisador,
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
P	Proteína
<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -nitrofenol butirato
RI	Rendimento de Imobilização, %
SDS	Dodecil sulfato de sódio (surfactante)
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida, min
V_e	Volume de enzima, mL
V_p	Volume total de poros
V_r	volume reacional, mL
V_s	Volume de solução, mL
α	slope, $\text{abs}\cdot\text{min}^{-1}$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivos gerais	17
1.2	Objetivos específicos	17
	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.3	Biocatálise	19
1.4	Lipases	20
1.5	Fosfolipases	22
1.6	Lecitase	24
1.7	Imobilização de enzimas	26
1.8	Suporte Immobead-350	29
	RESULTADOS 1 Estudo da imobilização de Lecitase Ultra em suporte macroporoso IB-350	32
2	INTRODUÇÃO	34
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1.1	<i>Materiais</i>	36
2.2	Métodos	36
2.2.1	<i>Pré-tratamento do Suporte IB-350</i>	36
2.2.2	<i>Determinação da concentração de proteína</i>	36
2.2.3	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	37
2.2.4	Caracterização do suporte	37
2.2.4.1	<i>Determinação da área superficial específica</i>	37
2.2.4.2	<i>Determinação do Volume Total de Poros</i>	38
2.2.4.3	<i>Determinação do Tamanho Médio de Poros</i>	39
2.2.5	Imobilização em Immobead-350	39
2.2.5.1	<i>Imobilização por adsorção</i>	39
2.2.5.2	<i>Estratégia de dois passos de imobilização</i>	39
2.2.5.3	<i>Imobilização direto a pH 10</i>	40
2.2.6	Determinação dos Parâmetros de Imobilização	40
2.2.7	Caracterização dos Biocatalisadores Imobilizados	41
2.2.7.1	<i>Influência da Presença de detergentes na Imobilização</i>	41
2.2.7.2	<i>Ensaio de Carga Máxima</i>	41
2.2.7.3	<i>Inativação Térmica</i>	41
2.2.7.4	<i>Estabilidade em Solvente</i>	42
2.2.7.5	<i>Eletroforese em gel de poli(acrilamida)-SDS</i>	42
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
2.3.1	<i>Caracterização do suporte</i>	43
2.3.2	<i>Efeito do pH na imobilização enzimática</i>	45
2.3.3	<i>Efeito da presença de diferentes detergentes na imobilização</i>	47
2.3.4	<i>Ensaio de carga máxima</i>	49
2.3.5	SDS-PAGE	51
2.3.6	<i>Estabilidade térmica e em solvente</i>	53
2.4	CONCLUSÃO	55
	RESULTADOS 2 Efeito das modificações químicas do suporte Immobead-350 nas propriedades catalíticas de Lecitase Ultra	56
3	INTRODUÇÃO	58
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1.1	<i>Materiais</i>	61

3.2	Métodos	61
3.2.1	FTIR	61
3.2.2	Modificação do Suporte IB-350	61
3.2.2.1	<i>Pré-tratamento e adição de grupos aldeído</i>	61
3.2.2.2	<i>Ativação com etilenodiamina (EDA)</i>	62
3.2.2.3	<i>Ativação com gluteraldeído (GLU)</i>	62
3.2.2.4	<i>Ativação com divinilsulfona (DVS)</i>	63
3.2.3	Imobilização enzimática	64
3.2.3.1	<i>Imobilização covalente via grupos epóxi</i>	64
3.2.3.2	<i>Imobilizações por adsorção</i>	64
3.2.3.3	<i>Adsorção seguida de cross-linking</i>	64
3.2.3.4	<i>Imobilização em IB-350-GLU</i>	65
3.2.3.5	<i>Imobilização em IB-350-DVS</i>	65
3.2.4	Determinação da atividade enzimática	65
3.2.5	Estabilidade térmica	66
3.2.6	Estabilidade em solvente	66
3.2.7	Estabilidade operacional	66
3.2.7	Estabilidade de estocagem	66
3.2.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS	67
3.2.10	Reações com diferentes substratos	67
3.2.10.1	<i>Hidrólise do Mandelato de Metila (MM)</i>	67
3.2.10.2	<i>Síntese enzimática do acetato de benzila</i>	68
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.3.1	FTIR	69
3.3.2	Imobilização da Lecitase seguindo diferentes estratégias	70
3.3.3	Estabilidade térmica e em solvente orgânico	73
3.3.4	Estabilidade operacional	75
3.3.5	Estabilidade de estocagem	76
3.3.6	SDS-PAGE	77
3.3.7	Atividade versus diferentes substratos	79
3.4	CONCLUSÃO	82
	ANEXO A	83
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas tem se tornado cada vez mais requerida em diferentes áreas industriais, alcançando altos níveis de implementação na produção de aromas, detergentes, modificação de alimentos, além de catalisar reações para obtenção de produtos na área de química fina e energias (biocombustíveis) (RODRIGUES et al., 2009, 2013a; SHELDON; VAN PELT, 2013). O potencial de aplicação das enzimas no meio industrial está principalmente relacionado a capacidade de participar de reações complexas sob condições experimentais amenas. Além disso, elas exibem alta régio, quimio e enatio-seletividade, como também elevada especificidade para uma vasta gama de substratos (RIOS et al., 2016; RUEDA et al., 2016).

Contudo, a utilização de enzimas imobilizadas em suportes sólidos tem se tornado um requisito para sua aplicação industrial, uma vez que essa estratégia soluciona os problemas gerados com a solubilidade dos biocatalisadores em meio aquoso (SANTOS et al., 2015a). Dentre as vantagens associadas à imobilização de enzimas, é possível destacar a reutilização do biocatalisador e a sua fácil a sua separação do meio reacional, minimizando os custos de produção e superando as desvantagens econômicas associadas à sua utilização, simplificando também o desenho e monitoramento dos biorreatores (DOS SANTOS et al., 2014a; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Outro aspecto interessante a ser considerado é a eficiência do protocolo de imobilização, quando este é desenvolvido de forma adequada, permite melhorar propriedades como estabilidade, seletividade e especificidade do biocatalisador (BEZERRA et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2015a; MATEO et al., 2007a). Assim, muitos pesquisadores têm concentrado seus esforços no sentido de testar diferentes métodos de imobilização para melhorar as propriedades de novos biocatalisadores, principalmente a estabilidade (RODRIGUES et al., 2013a; SANTOS et al., 2015c).

A estabilização de enzimas pode ser alcançada por diferentes métodos, basicamente, os principais são: adsorção física, ligação covalente, confinamento (dentro de um suporte inerte) e *cross-linking* (BEZERRA et al., 2015). Além disso, a natureza do suporte e o tipo de ligação química entre enzima e suporte são fatores essenciais para fornecer um biocatalisador com propriedades físico-químicas e bioquímicas específicas (GARCIA-GALAN et al., 2011; MATTE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2013a).

Dentro os vários suportes disponíveis para imobilização de enzimas, os macroporosos apresentam uma série de vantagens, desde que poros com largas dimensões facilitam a difusão do substrato e permitem a entrada de uma grande quantidade de enzimas, sem que ocorra obstrução do mesmo (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; SANTOS et al., 2015b). Em adição, a literatura relata que, independente do protocolo de imobilização, enzimas localizadas dentro dos poros do suporte não interagem com interfaces externas e, assim, evitam algumas causas de inativação, como: agregação e proteólise (devido à autólise, caso a enzima seja uma protease ou existam proteases contaminantes no extrato) (BARBOSA et al., 2013; BEZERRA et al., 2015).

Nesse trabalho, será abordado o desenvolvimento de estratégias para imobilização da fosfolipase A1 (Lecitase Ultra[®]), estudando diferentes protocolos de imobilização e estratégias de modificação do suporte para obtenção de biocatalisadores estáveis e com elevada atividade. Os resultados apresentados estão dispostos em duas partes: 1 e 2. Esses resultados (Parte 1 e Parte 2) abordam a preparação de biocatalisadores em suportes sem e com adição de modificação química, respectivamente, estudando aspectos como estabilidade e os fatores que estão relacionados ao processo de imobilização da enzima.

1.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi estudar diferentes estratégias de imobilização da Lecitase Ultra no suporte macroporoso IB-350, visando a otimização dos biocatalisadores preparados quanto à estabilidade e a capacidade de participar de duas diferentes reações, hidrólise do mandelato de metila e acetilação do álcool benzílico

1.2 Objetivos específicos

- Caracterização do suporte IB-350 originalmente ativado com grupos epóxi. Características morfológicas e textuais antes e após imobilização com a LU.
- Caracterização do suporte IB-350 modificado por diferentes protocolos de ativação e dos biocatalisadores produzidos através da imobilização nesses suportes.
- Estudar o processo de imobilização da enzima em IB-350: curso de imobilização, presença de detergentes, carregamento enzimático do suporte, estabilidade térmica e em solvente.

- Estudar o processo de imobilização da enzima por diferentes estratégias no suporte modificado: curso de imobilização, estabilidade de estocagem, estabilidade operacional, estabilidade térmica e em solvente.
- Estudo da versatilidade dos biocatalisadores através da catálise de dois diferentes substratos: mandelato de metila e álcool benzílico.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3 Biocatálise

A biocatálise pode ser definida como o uso de enzimas para catalisar reações bioquímicas. Enzimas são macromoléculas complexas produzidas por organismos vivos, que agem como catalisadores em reações bioquímicas específicas, necessárias para desenvolver e manter a vida (GURUNG et al., 2013; JEMLI et al., 2014; TANOKURA et al., 2015). Portanto, elas ajudam a acelerar as reações biológicas/bioquímicas, tanto dentro como fora da célula, assim como os catalisadores químicos em uma reação química (GURUNG et al., 2013).

Em comparação com os catalisadores químicos tradicionais, a utilização de enzimas oferece uma série de vantagens, uma vez que elas direcionam especificamente o curso da reação para um produto pré-determinado, reduzindo assim o risco de reações secundárias; trabalham em condições amenas de pH e temperatura e evitam a produção de produtos finais tóxicos; além disso elas são biocompatíveis, biodegradáveis e derivadas de fontes renováveis (BORRELLI; TRONO, 2015; JEMLI et al., 2014; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Com a necessidade de buscar soluções sustentáveis para a indústria, a demanda por enzimas está sendo cada vez mais requerida, permanecendo em um crescente aumento (ADRIO; DEMAIN, 2014). Em geral, o uso de enzimas em escala industrial garante economia de energia e evita a poluição, o que mantém o compromisso da implementação de estratégias renováveis e economicamente sustentáveis em processos industriais (BORRELLI; TRONO, 2015). No entanto, embora o uso de biocatalisadores como substituintes dos processos químicos seja vantajoso do ponto de vista ambiental, suas aplicações requerem certo grau de rentabilidade para justificar a sua competitividade de custos com catalisadores químicos convencionais, numa perspectiva econômica (JEMLI et al., 2014; LISZKA et al., 2012).

Com relação à obtenção de enzimas, os microrganismos serviram e continuam a servir como uma das maiores e mais úteis fontes dessas macromoléculas, além de serem uma fonte sempre disponível, pois seu crescimento não é afetado pelas flutuações sazonais (DEMAIN; ADRIO, 2008). Em meio industrial, a maior parte das enzimas usadas são de origem microbiana (mais que 50%), quando comparado ao número de enzimas derivadas de

plantas e animais. Além disso, as enzimas possuem a vantagem de crescer rapidamente em meios baratos e obter altos rendimentos (BORRELLI; TRONO, 2015).

Para tornar os biocatalisadores cada vez mais viáveis do ponto de vista econômico, os avanços da biotecnologia moderna e da engenharia de proteínas têm contribuído para melhorar o processo de produção de enzimas através da capacidade de introduzir ou modificar genes que são importantes para a produção de novos biocatalisadores (GURUNG et al., 2013). Várias estratégias de engenharia de proteínas têm sido desenvolvidas para fornecer enzimas com novas propriedades, adaptadas a aplicações industriais específicas, possibilitando também a redução do seu custo de produção. Além disso, a fermentação em larga escala e a tecnologia do DNA recombinante também estão sendo amplamente utilizadas para tornar a super expressão de enzimas economicamente viável. Esses avanços fornecem diferentes tipos de enzimas, com atividade e especificidade otimizadas, e adaptabilidade a novas condições, o que leva a sua crescente utilização em fins industriais (ADRIO; DEMAIN, 2014; GURUNG et al., 2013; JEMLI et al., 2014).

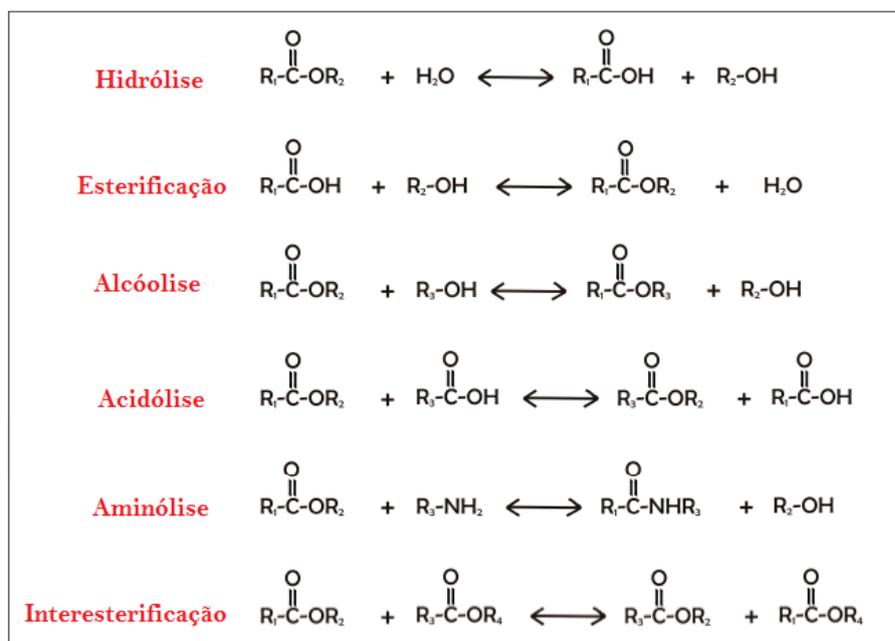
A maioria das enzimas atualmente utilizadas em processos industriais são hidrolases (PRAKASH et al., 2013). Entre estas, as lipases e as fosfolipases são as enzimas utilizadas para modificações de lipídios, ambas catalisam a hidrólise de ligações éster na presença de interfaces orgânica-aquosa e, sob condições não aquosas, podem catalisar várias reações inversas. Elas possuem um grande potencial biotecnológico e são considerados catalisadores versáteis devido às suas propriedades únicas. Além disso, esses biocatalisadores possuem ampla especificidade ao substrato, elevada enantiosseletividade, bem como estabilidade em solventes orgânicos e em condições rigorosas de temperatura e pH (BORRELLI; TRONO, 2015).

1.4 Lipases

Lipases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases (triacilglicerol hidrolases EC.3.1.1.3), cuja função natural é a clivagem de ligações ésteres em triglicerídeos (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Quando na presença de excesso de água, as lipases atuam na interface orgânico-aquosa para catalisar a hidrólise de ligações éster carboxilato, liberando ácidos graxos livres (FFA) e álcoois orgânicos. Como o equilíbrio entre as reações direta e inversa é controlado pela atividade de água (a_w) da mistura reacional, quando a presença de água é limitante, a reação reversa pode ocorrer e diferentes reações de transesterificação

podem ser alcançadas (DE ABREU *et al.*, 2014; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; LIMA *et al.*, 2015; RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009). A Figura 1 ilustra os tipos de reações que as lipases participam.

Figura 1 - Reações catalisadas por lipases



Fonte: BORRELLI e TRONO (2015).

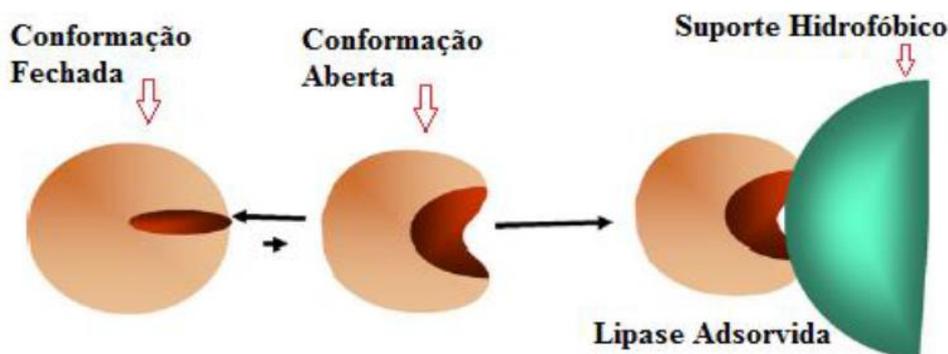
Com relação a obtenção das lipases, elas são consideradas ubíquas na natureza, sendo encontradas em todos os seres vivos, podendo ser obtidas de plantas, animais e microrganismos (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). Lipases de fontes microbianas, principalmente de bactérias e fungos, representam a classe mais utilizada de enzimas em aplicações biotecnológicas (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Isso ocorre porque a produção de enzimas por microrganismos confere algumas vantagens, como o fácil controle das condições de cultivo, podendo ser produzidas em escala industrial com baixo custo (BORRELLI; TRONO, 2015; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Dentre as várias classes de enzimas, as lipases estão entre as mais utilizadas na biocatálise, uma vez que elas catalisam uma ampla gama de reações, com alta seletividade e especificidade, podendo também ser utilizadas em diferentes meios reacionais (ADLERCREUTZ, 2013; JAEGER; EGGERT, 2002; ZHANG *et al.*, 2014). Estas propriedades tornaram as lipases relevantes industrialmente, possibilitando o estabelecimento de novas aplicações biotecnológicas, como a sua utilização em tecnologia de alimentos, na

produção de biodiesel ou em química fina. Para grande parte destas aplicações, as lipases são utilizadas na forma imobilizada (HERNANDEZ; GARCIA-GALAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

Além das características acima mencionadas, as lipases apresentam uma propriedade peculiar, que é o seu mecanismo de ativação interfacial (Figura 2). Quando em meio aquoso, o centro ativo dessas enzimas é isolado do meio reacional através de uma cadeia polipeptídica, denominada tampa (DE ABREU et al., 2014). Assim, elas podem assumir duas diferentes formas estruturais: a forma fechada, onde a cadeia polipeptídica isola o centro ativo do meio, e a forma aberta, que ocorre quando a interação com uma interface hidrofóbica provoca a abertura da tampa, tornando o seu sítio ativo acessível, viabilizando também a catálise (ADLERCREUTZ, 2013; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008a; MANOEL et al., 2015). O sítio ativo da lipase é formado por uma tríade catalítica Ser-His-Asp / Glu. O domínio que cobre o local do sítio ativo (tampa) pode ser constituído de uma única hélice, duas hélices ou uma região em loop (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Figura 2 - Ativação interfacial das lipases em suporte hidrofóbico.



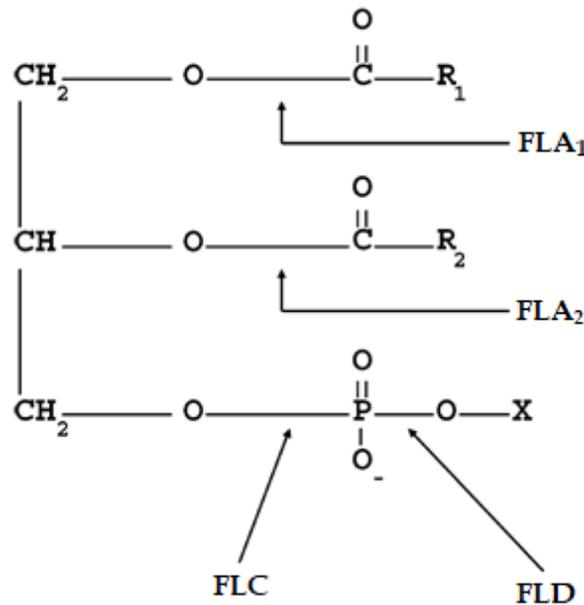
Fonte: MATEO *et al.* (2007).

1.5 Fosfolipases

As fosfolipases (A1, A2, C e D) são um importante grupo de enzimas, cuja função natural é hidrolisar fosfolípidios (FLs), liberando uma variedade de produtos, tais como: lisofosfolípidos, ácidos graxos livres (AGFs), di-acilgliceróis (DAGs), fosfato de colina e fosfatidatos, dependendo do local de hidrólise. Elas são amplamente encontradas na natureza e desempenham papéis cruciais em muitos processos bioquímicos, como a digestão e a inflamação (DE MARIA et al., 2007). A sua utilização em processos industriais tem crescido

juntamente com a capacidade de clonar e expressar seus genes em hospedeiros microbianos, em quantidades comercialmente atrativas (CLAUSEN, 2001; DE MARIA et al., 2007).

Figura 3 - Modo de ação das fosfolipases. Uma descrição generalizada de um fosfolipídio, onde X pode ser H, colina, etanolamina, inositol, etc. Os vários locais de ataque para a clivagem hidrolítica dos vários tipos de fosfolipase FLA₁, FLA₂, FLC e FLD são mostrados com setas.



Fonte: DE MARIA *et al.* (2007).

Assim como as lipases, as fosfolipases são ativadas pela presença de uma interface aquosa-orgânica. As fosfolipases são classificadas com base no seu sítio de clivagem do substrato, como mostrado na Figura 3 (BORRELLI; TRONO, 2015).

As fosfolipases A1 (FLA₁) e A2 (FLA₂) catalisam a hidrólise de ligações éster nas posições sn-1 e sn-2 dos fosfolipídios, respectivamente, produzindo assim um FFA e 2-acil lisofosfolipídio ou 1-acil lisofosfolipídio, respectivamente. As fosfolipases C (FLCs) e fosfolipases D (FLDs) são fosfodiesterases. A FLC cliva a ligação glicero-fosfato, liberando um DAG e um grupo principal fosforilado, enquanto o FLD cliva a ligação fosfo-diéster terminal, liberando o ácido fosfatídico (AF), juntamente com o grupo principal (BORRELLI; TRONO, 2015).

O foco desse trabalho será voltado para a fosfolipase A1 (EC 3.1.1.32), uma enzima intracelular frequentemente ligada à membrana, que não requer íons cálcio para expressar sua atividade (MISTRANTA; FORSSELL; POUTANEN, 1995). Essas enzimas

catalisam a desacilação de fosfolipídios, hidrolisando seu grupo 1-acil em um lisofosfolipídio e em um ácido graxo livre (ALVES et al., 2015). Além disso, elas são de particular interesse para aplicações industriais, como para a produção de emulsificantes, glicerídeos, com uma interessante composição de ácidos graxos, e, principalmente, no processo de degomagem de óleos (DE MARIA et al., 2007; YANG et al., 2006).

1.6 Lecitase

Lecitase® Ultra é uma nova lipase microbiana desenvolvida e comercializada pela Novozymes, Denmark, que apresenta propriedades tanto de lipase como de fosfolipase A1, em único sítio ativo (MISHRA et al., 2009; YANG et al., 2006). Ela é uma hidrolase éster carboxílica obtida da fusão dos genes de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Fusarium oxysporum*, produzida por fermentação submersa em uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* (DE MARIA et al., 2007).

Essa nova enzima apresenta características aproximadamente similares à estabilidade da lipase de TLL e à atividade da enzima de *F. oxysporum* (DE MARIA et al., 2007; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007a). Como a Lecitase é um produto relativamente novo no mercado, poucos artigos podem ser encontrados na literatura sobre seu uso, no entanto, sabe-se que elas possuem propriedades catalíticas que são usadas na síntese dirigida de fosfolipídios (CUNHA et al., 2008).

Assim como as lipases, a Lecitase também apresenta o mecanismo de ativação interfacial (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008b), descrito no tópico 1.2. Essa fosfolipase foi inicialmente desenvolvida para participar de processos de degomagem, no entanto suas aplicações podem se estender desde a sua utilização como um biocatalisador enantiosseletivo em química fina, sendo muito útil para a preparação de intermediários enantiomericamente puros (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007a), à esterificação de resíduos alimentares em monoacilgliceróis, obtendo altos rendimentos de conversão (GONÇALVES et al., 2013). A Tabela 1 apresenta diferentes aplicações da Lecitase imobilizada em diversos suportes.

Tabela 1 - Diferentes métodos de imobilização e aplicações da Lecitase® Ultra em diversas reações de interesse industrial.

Biocatalisador	Método de imobilização	Substrato	Reação	Ref.
Lecitase-micelas reversas de AOT/isooctano	Encapsulamento	- Ácido oléico e etanol	Esterificação	(GONÇALVES et al., 2016)
Lecitase - CNBr-agarose/ Lecitase-octyl-agarose	Ligação covalente / ativação interfacial	- Fenilacetato de metila - R e S mandelato de metila	Hidrólise	(GARCIA-GALAN et al., 2014)
Lecitase -octyl agarose	Adsorção física	- R e S mandelato de metila - 2-O-butanoil-2-ácido fenilacético	Hidrólise enantiosseletiva	(FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007a)
Lecitase-gelozima (matriz gelatinosa)	Ligação covalente	- α -aminoácidos - Ésters de glicidato	Resolução enantiomérica (hidrólise)	MISHRA et al., 2009
Lecitase-octyl-glyoxyl agarose	Adsorção física Ligação covalente	- R e S mandelato de metila - Hexanoato de etila	Hidrólise	RUEDA et al., 2015
Lecitase-core-shell polymeric	Ligação covalente	-Triacetina - R e S mandelato de metila	Hidrólise	MANOEL et al., 2016
Lecitase-CNBR / Lecitase-PEI	Ligação covalente / Adsorção iônica	- Carboidratos peracetilados	Hidrólise regiosseletiva	FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008b
Lecitase livre	-	- Fosfatidilcolina	Hidrólise	(LIM et al., 2015)
Lecitase- CNBR-PEI / Lecitase- CNBR-DS / Lecitase- octyl-PEI / Lecitase- octyl-DS	Ligação covalente / Adsorção física	- R e S mandelato de metila - Hexanoato de etila - Fenilacetato de etila	Hidrólise	(DOS SANTOS et al., 2014b)

Uma vez que a LU é comercializada na forma solúvel, sua utilização no processo industrial é limitada devido ao seu elevado custo, instabilidade e dificuldade de recuperação no final do processo. Por isso estratégias de imobilização de LU estão sendo desenvolvidas para superar as desvantagens da enzima livre, a fim de garantir a recuperação e reutilização do biocatalisador e melhorar propriedades como atividade, estabilidade e seletividade (LIU et al., 2012). As propriedades catalíticas dessa enzima podem ser modificadas por diferentes protocolos de imobilização (DOS SANTOS et al., 2014b), o que aumenta o número de possíveis aplicações (GONÇALVES et al., 2016).

1.7 Imobilização de enzimas

A estratégia de imobilização em suportes sólidos tende a ser uma solução eficiente para os problemas associados com a utilização de enzimas solúveis (DEEPTHI et al., 2014; LV et al., 2014), uma vez que elas possuem estabilidade moderada frente às condições rigorosas de pH e temperatura e podem ser inibidas pelo substrato ou, até mesmo, pelo produto (BETIGERI; NEAU, 2002; LERESCHE; MEYER; AG, 2006).

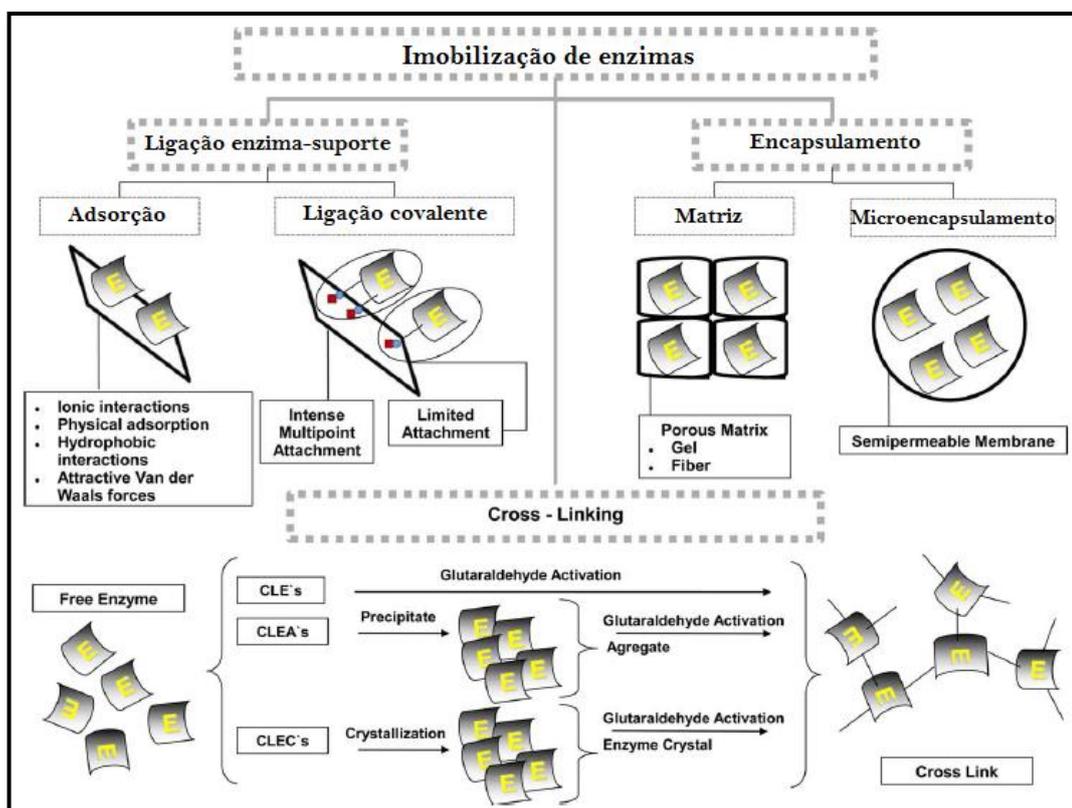
O processo de imobilização de enzimas é frequentemente requerido para aplicações industriais, pois permite a recuperação e o reuso do biocatalisador, possibilitando seu uso em operações contínuas e de leito fixo; facilitando, assim, os processos em larga-escala e a formulação econômica da indústria biotecnológica (BEZERRA et al., 2015; SHELDON; VAN PELT, 2013). Além disso, essa estratégia permite uma fácil separação do produto, minimizando ou eliminando a contaminação de proteínas no mesmo (SHELDON; VAN PELT, 2013). Por conseguinte, a imobilização de enzimas pode ser uma solução eficiente para outras limitações enzimáticas, tais como estabilidade, atividade, seletividade, especificidade ou pureza (GARCIA-GALAN et al., 2011; MATEO et al., 2007a).

No entanto, é importante salientar que o termo “imobilização” não necessariamente implica na estabilização da enzima. Caso o protocolo de imobilização não seja bem implementado, de forma a permitir interações não controladas entre enzima e suporte, as enzimas imobilizadas podem ser ainda menos estáveis do que as enzimas livres (BARBOSA et al., 2013; GARCIA-GALAN et al., 2011; MATEO et al., 2007a; SINGH et al., 2013), já que isso ocasiona mudanças conformacionais na sua estrutura, levando a desnaturação da mesma (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005). Assim, o

protocolo de imobilização é um fator chave para o sucesso dos processos industriais, por isso ele deve ser eficientemente avaliado a fim de melhorar a atividade, estabilidade e seletividade do biocatalisador (RODRIGUES et al., 2013b).

Com relação aos métodos de imobilização, eles basicamente podem ser divididos em três categorias: ligação enzima-suporte; encapsulamento da enzima (em suportes inertes) e reticulação, também conhecida como *cross-linking*, na qual as enzimas são ligadas uma às outras por meio de agentes reticulantes (GUISAN, 2006; SHELDON; VAN PELT, 2013). As formas de interação que permitem a ligação entre enzima e suporte variam de adsorção física reversível, ligações iônicas e ligações covalentes estáveis (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). A Figura 4 ilustra uma representação esquemática das estratégias de imobilização de enzimas, anteriormente mencionadas.

Figura 4 - Principais estratégias para imobilização de enzimas.



Fonte: BEZERRA et al. (2015).

Neste trabalho, os métodos de imobilização adotados foram adsorção física, ligação covalente multipontual e *cross-linking*. A adsorção física é a estratégia mais empregada para imobilização de enzimas, por promover uma ligação enzima-suporte simples,

rápida e barata, com uma alta atividade catalítica (BEZERRA et al., 2015; GARCIA-GALAN et al., 2011). Nesse método, o biocatalisador é formado pela adesão da enzima à superfície do suporte insolúvel, através de interações fracas ou não covalentes, como van der Waals, forças hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (GUISAN, 2006; STEPANKOVA et al., 2013). Além disso, a adsorção apresenta poucos efeitos deletérios para a atividade e seletividade da enzima, é de baixo custo e pode ser facilmente executada (CUNHA et al., 2008; DE MATOS, 2014). No entanto, como as ligações envolvidas na adsorção física são de natureza fraca, é possível que a enzima se desorva do suporte quando ocorrerem alterações nas condições do meio (como variações de pH, temperatura, concentração de substratos, polaridade do solvente, etc), podendo se suceder durante as operações industriais (GUISAN, 2006; SHELDON; VAN PELT, 2013).

A imobilização por ligação covalente não é tão comum quanto à adsorção física, no entanto as ligações formadas entre enzima e suporte são mais estáveis e evitam o fenômeno de desorção (CANTONE et al., 2013; SHELDON, 2007). Esse método baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos funcionais que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima, os quais são ligados um ao outro através de interações forte, denominadas ligações covalentes (CANTONE et al., 2013; DE CASTRO et al., 2004). Devido a essa forte interação, o biocatalisador torna-se altamente estável às alterações ambientais, tais como: agitação, pH, temperatura, presença de solventes, dentre outros (CANILHO et al., 2013).

A ligação covalente multipontual de enzimas promove uma forte rigidificação da estrutura da enzima, pois todos os grupos envolvidos na imobilização devem manter as suas posições relativas inalteradas durante qualquer mudança conformacional induzida por agentes de distorção, sendo assim, essa estratégia é considerada uma ferramenta poderosa para produzir biocatalisadores mais estáveis frente à variações nas condições do meio (DOS SANTOS et al., 2015a; GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2013; MATEO et al., 2007a; RODRIGUES et al., 2008). Para que a imobilização covalente multipontual seja bem sucedida, é necessário que haja uma interação entre vários resíduos da mesma molécula de enzima com grupos ativos do suporte (RODRIGUES et al., 2008). Vários tipos de grupos reativos para esse método de imobilização podem ser citados, tais como: suportes glioxil, suportes com di-vinil-sulfona (DVS), suportes ativados com glutaraldeído e suportes epóxi-ativados (SANTOS et al., 2015c).

Além das técnicas anteriormente mencionadas, o *cross-linking* também tem sido uma estratégia de imobilização bastante utilizada para melhorar as propriedades enzimáticas (RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011), como dito anteriormente, esse método se refere a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de enzima por meio de reagentes reticulantes, como o glutaraldeído (MATEO et al., 2007b). Nessa estratégia, a enzima pode ser previamente imobilizada em um suporte através de métodos reversíveis, como adsorção, por exemplo, seguida do passo *cross-linking* entre as próprias moléculas de enzima e também o suporte, formando ligações estáveis que previnem a dessorção da enzima no meio (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

1.8 Suporte Immobead-350

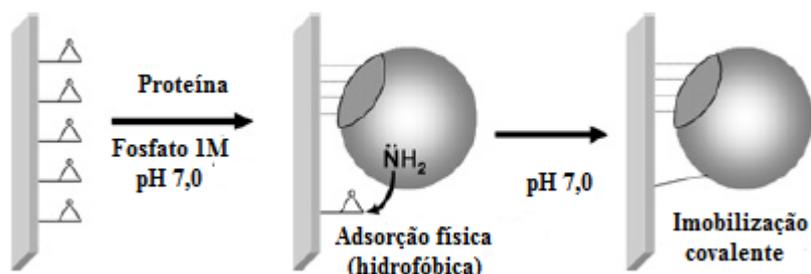
O Immobead ou suporte epóxi PMMA, como também é conhecido, é um copolímero reticulado de metacrilato, funcionalizado com ligantes epóxi, que reage principalmente com grupos amino de lisinas, presentes na superfície da enzima (BABICH *et al.*, 2012). Esse suporte é composto por esferas inertes na natureza, com partículas que variam de 300-700 μm de tamanho e poros de 100 nm, sendo a designação 350 relativa à sua área superficial, de 100 a 300 m^2/g . (DE MATOS, 2014; DHAKE et al., 2012; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

Suportes epóxi são matrizes bastante utilizadas para realizar uma imobilização fácil de proteínas, tanto em escala de laboratório como industrial. Como eles são fornecidos diretamente na forma ativada, não há a necessidade de qualquer outro tratamento para imobilizar a enzima (MATEO et al., 2007c). Os grupos epóxi são bastante estáveis em pH neutro, podendo ser armazenados durante longos períodos de tempo. Além disso, quando seco e à baixa temperatura, ele pode ser armazenado durante meses, sem alterar a sua reatividade (BARBOSA et al., 2013; DE MATOS, 2014; GUI SAN, 2006). Em condições alcalinas, os grupos epóxi são menos estáveis, porém, a sua meia-vida pode ainda ser medida em semanas, permitindo a incubação da enzima e do suporte por longos períodos de tempo (BARBOSA et al., 2013; MATEO et al., 2007c).

No presente trabalho, uma das estratégias utilizadas para imobilização da enzima no suporte foi o mecanismo de dois passos: no qual, primeiramente é produzida uma adsorção física rápida e suave da proteína no suporte e, em seguida, ocorre uma reação covalente entre

a proteína adsorvida e os grupos epóxi presentes na vizinhança (Figura 5) (DE MATOS, 2014; MATEO et al., 2007c). Para que o primeiro mecanismo (adsorção física) possa ocorrer de forma efetiva, os suportes epóxi comerciais utilizados para imobilização de enzimas devem ser bastante hidrofóbicos, a fim de adsorver proteínas quando são incubados em alta força iônica (por interação hidrofóbica) (MATEO et al., 2007c).

Figura 5 - Método de imobilização entre o suporte-epóxi-ativado e a enzima.



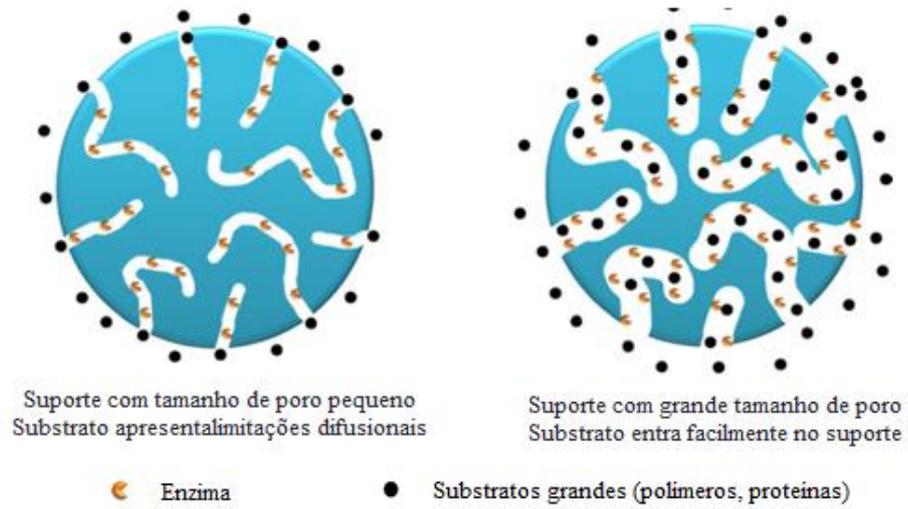
Fonte: MATEO *et al.* (2007b).

Os grupos epóxi podem reagir com diferentes grupos presentes na superfície das enzimas, tais como: amino, tiol, fenólico e imidazol. Outra característica desses suportes é que eles possuem curtos braços espaçadores, que mantêm fixos os grupos reativos das enzimas, envolvidos na imobilização, em suas posições relativas (DE MATOS, 2014; MATEO et al., 2007c).

Por ser uma sílica macroporosa, o Immobead-350 (IB-350) apresenta algumas vantagens, uma vez que a imobilização de enzimas no interior de um sólido com estrutura porosa pode melhorar sua estabilidade operacional sem afetar a rigidez da estrutura da enzima, como também permitir que as moléculas de enzima estejam completamente dispersas e impossibilitadas de interagir com qualquer interface externa (MATEO et al., 2007b; SANTOS et al., 2015a). Dessa forma, essa estratégia de imobilização irá prevenir a agregação, autólise ou até mesmo proteólise por proteases do extrato, já que as enzimas estarão dispersas e imobilizadas no suporte (BEZERRA et al., 2015; MATEO et al., 2007a).

Outra vantagem da utilização de suportes com grande diâmetro de poro é que eles facilitam a difusão dos substratos, principalmente no caso de macromoléculas maiores, como proteínas ou outros polímeros. Suportes com diâmetro de poro pequeno limitaria a entrada dessas moléculas no suporte. A Figura 6 mostra as diferenças da difusão de moléculas nesses tipos de suporte.

Figura 6 - Diferenças na difusão do substrato em suportes com pequeno e grande tamanho de poro.



Fonte: SANTOS (2015).

RESULTADOS 1

*Estudo da imobilização de Lecitase Ultra em suporte
macroporoso IB-350.*

RESUMO

Diante da busca por processos verdes que substituam os catalisadores químicos tradicionais, as enzimas surgem como uma alternativa eficiente por dispor de uma série vantagens catalíticas. A estratégia de imobilização em suportes sólidos vem sendo muito utilizada para produzir biocatalisadores estáveis e com aplicações em diversas reações de interesse industrial. Nesse trabalho, a Lecitase Ultra foi imobilizada através de diferentes estratégias no suporte Immobead-350, com o intuito de testar a eficiência dos biocatalisadores formados quanto à atividade e estabilidade. Inicialmente, foram estudadas as melhores condições de imobilização da Lecitase (pH de imobilização, presença de detergente e carga máxima). Em seguida, os biocatalisadores foram testados quanto à sua estabilidade térmica e em solvente. O derivado Leci-Ads apresentou a maior atividade enzimática ($At_D = 16,1 \text{ U/g}$) através da hidrólise do *p*-nitrofenolbutirato (*p*-NPB). A imobilização na presença de detergentes (Triton X-100 e SDS), em duas diferentes concentrações (0,1 % e 0,01%), foi testada para o derivado Leci-CVL e o melhor resultado foi na presença de Triton X-100 0,01 % ($At_D = 16,7 \text{ U/g}$). A capacidade máxima de imobilização do Immobead-350 é superior a 300 mg de proteína/g de suporte. Esse elevado valor está relacionado ao grande tamanho de poro suporte (51,1 nm), que possui caráter macroporoso. Os derivados que apresentaram maior estabilidade foram Leci-ads e Leci-2p (24h de incubação – pH 10). Leci-ads obteve tempos de meia-vida de 184,8 e 106,6 min na temperatura de 50 °C, pH 5,0 e 7,0, respectivamente, e Leci-CVL foi mais estável na condição de 50 °C - pH10 ($t_{1/2} = 61,9 \text{ min}$) e na presença de acetonitrila 30 % ($t_{1/2} = 108,0 \text{ min}$). Mediante os resultados obtidos, verifica-se que as estratégias de imobilização foram eficientes em formar biocatalisadores com propriedades interessantes para aplicação industrial, tendo em vista à elevada atividade e estabilidade dos biocatalisadores produzidos e às vantagens de imobilização em um suporte macroporoso.

Palavras-chave: Imobilização, Lecitase, protocolos de imobilização e estabilidade.

2 INTRODUÇÃO

O interesse pela aplicação de enzimas em processos industriais tem aumentado ao longo dos anos devido a crescente busca por processos verdes que possam substituir as sínteses químicas tradicionais (BRÍGIDA et al., 2007; RIOS et al., 2016; SHELDON; VAN PELT, 2013). Além disso, a utilização desses biocatalisadores oferece uma série de vantagens, uma vez que eles possuem elevada régio e enantio seletividade, elevada especificidade ao substrato e alta atividade sob condições suaves (REETZ, 2002). Porém, quando submetido à condições rigorosas de pH e temperatura, as enzimas apresentam uma certa instabilidade, sendo necessária a utilização de estratégias de imobilização para superar essas limitações (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Em termos de viabilidade, a imobilização enzimática é considerada uma solução simples para os problemas associados com a solubilização de proteínas, pois permite a recuperação do biocatalisador, seu uso contínuo e repetido em reações industriais e a redução com os custos de separação do produto (GARCIA-GALAN et al., 2011; MATTE et al., 2014). Para garantir um eficiente processo de imobilização, o protocolo de imobilização deve ser estrategicamente desenvolvido, a fim de evitar a contaminação do produto pela liberação da enzima e a perda da atividade catalítica (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; SHELDON, 2007). Nesse caso, características como a natureza do suporte e o tipo de ligação química enzima-suporte devem ser estudadas com o objetivo de conseguir um biocatalisador ideal para aplicações de interesse, com propriedades físico-químicas, bioquímicas e mecânicas específicas (GARCIA-GALAN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013b; SANTOS et al., 2015b).

O suporte escolhido para as estratégias de imobilização desse trabalho foi o Immobead-350, que é composto por esferas inertes na natureza, sendo classificado como um copolímero reticulado de metacrilato com grupos epóxi funcionais, também conhecido por ser altamente hidrofóbico. O IB-350 reage principalmente com grupos amino de lisinas, presentes na superfície da enzima (BABICH et al., 2012; DE MATOS, 2014; DHAKE et al., 2012; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; MATTE et al., 2017).

Suportes epóxi são adequados para imobilização de proteínas e esses dispõem de algumas facilidades, como, por exemplo: eles são fornecidos diretamente na forma ativada e permanecem estáveis durante longos períodos de armazenamento, mesmo em meio aquoso neutro (BARBOSA et al., 2013; MATEO et al., 2007c). Além dessas características, eles

também apresentam excelentes propriedades que permitem a formação de imobilizações covalentes multipontuais, uma vez que possuem uma densa monocamada de grupos epóxi reativos e estáveis no suporte, os quais são capazes de reagir com diferentes grupos presentes na superfície da proteína (amino, tiol, fenólico e imidazol). Outro fator importante é que a reação entre enzima e suporte pode ser facilmente interrompida bloqueando os grupos epóxi com diferentes reagentes (mercaptoetanol, etanolamina, glicina, etc) (MATEO et al., 2000, 2007b; MATTE et al., 2017).

Como, além de ser funcionalizado com ligantes epóxi, o Immobead-350 também apresenta um caráter macroporoso, é importante destacar que a imobilização de enzimas no interior de um sólido com estrutura porosa permite que as moléculas estejam completamente dispersas e impossibilitadas de interagir com qualquer interface externa (SANTOS et al., 2015b), estabilizando, assim, a proteína imobilizada e prevenindo a agregação, autólise ou até mesmo proteólise por proteases do extrato (que podem também estar dispersas e imobilizadas) (BEZERRA et al., 2015; MATEO et al., 2007a).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi imobilizar a Lecitase Ultra no suporte Immobead-350 através de diferentes protocolos de imobilização, visando testar as melhores condições de imobilização, bem como estudar os parâmetros e as propriedades desses novos biocatalisadores produzidos. A enzima Lecitase Ultra (LU) é uma preparação comercial interessante, obtida por técnicas de engenharia genética, através da fusão dos genes de *Thermomyces lanuginosus* e da fosfolipase de *Fusarium oxysporum* (ALVES et al., 2015; MISHRA et al., 2009). Uma característica peculiar da LU é que ela possui a estabilidade da lipase de *T. lanuginosus* e a atividade da fosfolipase de *F. oxysporum* (GARCIA-GALAN et al., 2014).

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Materiais

Etilenodiamina e *p*-nitrofenil butirato foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Lecitase (15,49 mg/mL) foi obtida da Novozymes (Espanha). O suporte Immobead-350 foi fornecido pela empresa Chiral Vision®. Todos os outros reagentes empregados foram obtidos de grau analítico.

2.2 Métodos

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como a média destes valores e o desvio padrão (geralmente abaixo de 10 %).

2.2.1 Pré-tratamento do Suporte IB-350

O pré-tratamento do suporte foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Dhake et al. (2012), com algumas modificações, no qual o suporte passou por um processo de hidratação, a fim de retirar o ar aprisionado no interior das esferas de IB-350. Nesse procedimento, 2 g de IB-350 foram tratados com 25 mL de etanol (95%) por 4h, a 25 °C. Ao longo desse tempo, as esferas de IB-350 foram cuidadosamente decantadas. Em seguida, o suporte foi filtrado e lavado 4 a 5 vezes com água destilada (20 mL) e então equilibrado em tampão fosfato de sódio (25 mM - pH 7,0).

2.2.2 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), que baseia-se na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Albumina Bovina Cristalina (BSA) foi utilizada como padrão para construir a curva de calibração.

2.2.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima solúvel ou suspensão foi determinada através da hidrólise do substrato *p*-nitrofenol buritaro (*p*-NPB) 50 mM em acetonitrila, liberando o *p*-nitrofenol como produto. O *p*-nitrofenol foi quantificado por espectrometria utilizando um espectrofotômetro (Thermo Scientific®) com comprimento de onda de 348 nm (fator da curva de calibração do *p*-nitrofenol = 0,1912, sob estas condições). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de *p*-NPB por minuto a 25 °C, pH 7. Para determinar essa atividade, 50-70 μL de solução enzimática ou suspensão é adicionada a 2,5 mL de tampão 25 mM, seguido da adição de 50 μL de *p*-NPB, com posterior leitura no espectrofotômetro.

2.2.4 Caracterização do suporte

As imagens do suporte foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o equipamento INSPECT S50 EIF. As características texturais das amostras foram avaliadas por isotermas de adsorção-dessorção de N₂ a 77 K, usando o equipamento Autosorb IQ3 (*Quantachrome Instruments*, EUA). As amostras foram previamente degaseificadas sob vácuo e aquecimento (taxa de 1 °C min⁻¹) até atingir a temperatura de 120 °C, em seguida foram mantidas nessa temperatura por um período de 10 horas. Durante a análise, quantidades controladas de nitrogênio são alimentadas de forma gradual e a quantidade adsorvida pela amostra é calculada pelo aumento da pressão.

2.2.4.1 Determinação da área superficial específica

A área superficial específica de um sólido adsorvente é usualmente calculada através da equação de BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938) na sua forma linear (Equação 1 ou 2), que, num gráfico de $(p/p^0)/n(1 - (p/p^0))$ versus p/p^0 , permite o cálculo do número de mols (n_m) ou volume adsorvido (v_m) numa monocamada completa.

$$\frac{(p/p_0)}{n(1-(p/p_0))} = \frac{1}{n_m c} + \left(\frac{c-1}{n_m c}\right) (p/p_0) \quad (1)$$

ou

$$\frac{(p/p_0)}{v(1-(p/p_0))} = \frac{1}{v_m C} + \left(\frac{C-1}{v_m C}\right) (p/p_0) \quad (2)$$

onde p é a pressão do adsorbato, p_0 é a pressão de saturação na temperatura do experimento, n é o número de mols adsorvido, v é o volume adsorvido e C é uma constante empírica da equação.

Após este procedimento o valor de n_m é substituído na Equação 3.

$$a_{BET} = n_m \cdot L \cdot \sigma \quad (3)$$

onde L representa o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) e σ , a área média ocupada por cada molécula adsorvida na monocamada formada que, para o caso do nitrogênio a 77 K, usualmente é assumida com o valor de $0,162 \text{ nm}^2$.

Assim, para o caso do nitrogênio, temos (Equações 4 e 5):

$$\frac{a_{BET}}{m^2 g^{-1}} = 0,097 \cdot \frac{n_m}{\mu mol g^{-1}} \quad (4)$$

ou

$$\frac{a_{BET}}{m^2 g^{-1}} = 4,35 \cdot \frac{v_m}{cm^3 g^{-1}} \quad (5)$$

2.2.4.2 Determinação do Volume Total de Poros

O volume total de poros expressa a quantidade de vazios específica (por unidade de massa) na estrutura do sólido adsorvente. Esse parâmetro é calculado pela determinação do volume adsorvido na maior pressão relativa atingida num experimento com N_2 ($10 \approx pp$). Dispondo do número de mols adsorvido nesta pressão relativa (n), aplica-se a Equação 6.

$$V_p = n \cdot \frac{M}{\rho_{N_2}} \quad (6)$$

onde M é a massa molar do N_2 ($28,09 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) e ρ é a densidade do nitrogênio líquido ($0,809 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

2.2.4.3 Determinação do Tamanho Médio de Poros

O tamanho médio de poros é um parâmetro automaticamente calculado pelo *software* Autosorb-1 MP e gerado num relatório. Para fins práticos, o tamanho ou diâmetro médio de poros é dado pela Equação 7 a seguir:

$$d_p = 4 \cdot \frac{V_p}{a_{BET}} \quad (7)$$

sendo V_{TP} o valor do volume total de poros e a_{BET} o valor da área superficial específica.

2.2.5 Imobilização em Immobead-350

2.2.5.1 Imobilização por adsorção

Um total de 1 g de suporte foi ressuspendido em 10 mL de solução enzimática (concentração máxima de proteína de 10 mg/ mL), preparadas em tampão fosfato de sódio (pH 7 - 25 mM) a 25 ° C, sob agitação suave durante 2 h. Após a imobilização, as preparações enzimáticas foram lavadas com tampão fosfato de sódio 25 mM - pH 7 para eliminar qualquer proteína remanescente que não tenha se ligado ao suporte. O derivado foi denominado Leci-Ads.

2.2.5.2 Estratégia de dois passos de imobilização

O processo de imobilização no suporte Immobead-350 se deu por um mecanismo de dois passos. Inicialmente, 1 g do suporte foi suspenso em 10 mL de solução enzimática (concentração máxima de proteína de 10 mg / mL) na presença de tampão fosfato de sódio, pH 7,0 (25 mM), a 25 °C durante um período de 3 h. Após essa etapa, o derivado foi ressuspendido em tampão bicarbonato de sódio, pH 10 (25 mM - razão 1:10 m/v) e diferentes tempos de incubação foram testados (1, 5, 16 e 24 horas). Após a imobilização, as diferentes preparações foram incubadas em solução de EDA 1M, pH 10 por 18 horas, a 25 °C (DOS SANTOS et al., 2015a). Nessa etapa final, o EDA promove o bloqueio de alguns agentes reativos que podem interagir com a enzima, causando alterações conformacionais. A nomenclatura do derivado é Leci-2p.

2.2.5.3 Imobilização direto a pH 10

1 g do suporte foi suspenso em 10 mL de solução enzimática (concentração máxima de proteína de 10 mg / mL) na presença de tampão bicarbonato de sódio, pH 10,0 (25 mM), a 25 °C durante um período de 24 h. Após a imobilização, o derivado foi incubado em solução de EDA 1M, pH 10 por 18 horas. O derivado foi denominado Leci-CVL.

2.2.6 Determinação dos Parâmetros de Imobilização

Os parâmetros de imobilização utilizados nesse trabalho foram calculados como descrito por dos Santos et al. (2017). O cálculo da atividade oferecida é representado pela Equação 8:

$$At = \left(\left(\frac{\alpha \cdot f \cdot V_r \cdot D}{V_e} \right) / (C) \right) \cdot C_0 \quad (8)$$

onde At é a atividade enzimática (U.g⁻¹), α é a taxa de consumo do *p*-NPB (abs.min⁻¹), f é o fator da curva de calibração do *p*-nitrofenol ($\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{abs})$), Vr é o volume de reação (mL), D representa a diluição da solução enzimática (mL/mL), Ve é o volume de solução enzimática (mL), C é a concentração de proteínas (mg.mL⁻¹) e C₀ é a carga oferecida (mg P . g⁻¹suporte).

O fator (f) foi calculado segundo a curva de calibração do produto da reação, que é o *p*-nitrofenol, através da Equação 9:

$$\text{fator (f)} = \frac{I}{\varepsilon \cdot L} \quad (9)$$

A atividade do derivado foi calculada segundo uma variação da Equação (8), determinada pela Equação 10, a seguir:

$$\text{Atividade do derivado (At}_d) = \alpha \cdot f \cdot \left(\frac{V_r}{V_e} \right) \cdot \left(\frac{V_s}{M_b} \right) \quad (10)$$

onde V_s é o volume de solução enzimática (mL) e M_b é a massa do biocatalisador (g), ambos utilizados na imobilização.

O rendimento de imobilização (RI %), em termos de atividade hidrolítica, foi calculado pela Equação 11:

$$RI (\%) = \frac{At_{of_i} - At_f}{At_{of_i}} \cdot 100 \quad (11)$$

Em que At_{of_i} é a atividade oferecida no início do curso de imobilização ($U \cdot g^{-1}$) e At_f é a atividade após o processo de imobilização ($U \cdot g^{-1}$).

A atividade teórica foi calculada pela Equação 12:

$$At_t = \frac{RI \cdot At_{of_i}}{100} \quad (12)$$

em que At_t é atividade teórica, RI é o rendimento de imobilização e At_{of_i} é a atividade oferecida no início do curso de imobilização ($U \cdot g^{-1}$).

2.2.7 Caracterização dos Biocatalisadores Imobilizados

2.2.7.1 Influência da Presença de detergentes na Imobilização

Para verificar a influência dos detergentes Triton X-100 e SDS no processo de imobilização, a Lecitase foi imobilizada na presença e ausência dos mesmos. Neste ensaio, 0,1 g de suporte foi adicionado a uma solução de concentração variada (0,1 % ou 0,01 % dos detergentes), contendo 10,0 mg de proteína / mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 1/10 m/v. Outra imobilização foi realizada nas mesmas condições, porém sem a adição de detergente. As atividades dos derivados foram determinadas através da hidrólise do *p*-NPB. Os parâmetros de imobilização foram calculados para comparar a eficiência dos derivados.

2.2.7.2 Ensaio de Carga Máxima

Preparações enzimáticas da Lecitase contendo de 0,5 mg a 2,0 mg de proteína / mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0, foram adicionadas a 0,1 g de suporte em uma proporção 1/10 m/v a 25 °C. Amostras de sobrenadante foram retiradas periodicamente para medir atividade enzimática através da hidrólise do *p*-NPB.

2.2.7.3 Inativação Térmica

Para verificar o efeito da temperatura sobre a estabilidade dos derivados, 1g da enzima imobilizada foi incubada em 10 mL de diferentes soluções tampão: citrato - pH 5,

fosfato de sódio - pH 7 e bicarbonato de sódio - pH 10, ambos 25 mM, na temperatura de 50 °C. Amostras foram retiradas periodicamente e a atividade foi medida através da hidrólise do *p*-NPB. A constante de inativação térmica foi calculada pela Equação 13, utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (SADANA; HENLEY, 1987).

$$AR = (1 - \alpha). e^{-K_d.t} + \alpha \quad (13)$$

AR é a Atividade Relativa (A/A_0); α é razão entre a atividade enzimática do estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial (A_0); K_d é a constante de inativação térmica de primeira ordem (h^{-1}) e t é o tempo de incubação da solução enzimática (h).

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da enzima foi definido como o tempo necessário para atingir 50% da atividade inicial, calculado pela Equação 14.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5-\alpha)}{K_d.(1-\alpha)} \quad (14)$$

2.2.7.4 Estabilidade em Solvente

Nesse ensaio, os derivados preparados foram incubados em uma solução 30 % de acetonitrila / 70 % de tampão Tris HCl 100mM a pH 7, em uma razão 1/10 m/v. As amostras foram retiradas periodicamente e a atividade foi medida utilizando o substrato *p*-NPB. Os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) foram determinados pelo modelo de decaimento exponencial não linear de Sadana e Henley (Equação 13) (SADANA; HENLEY, 1987).

2.2.7.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

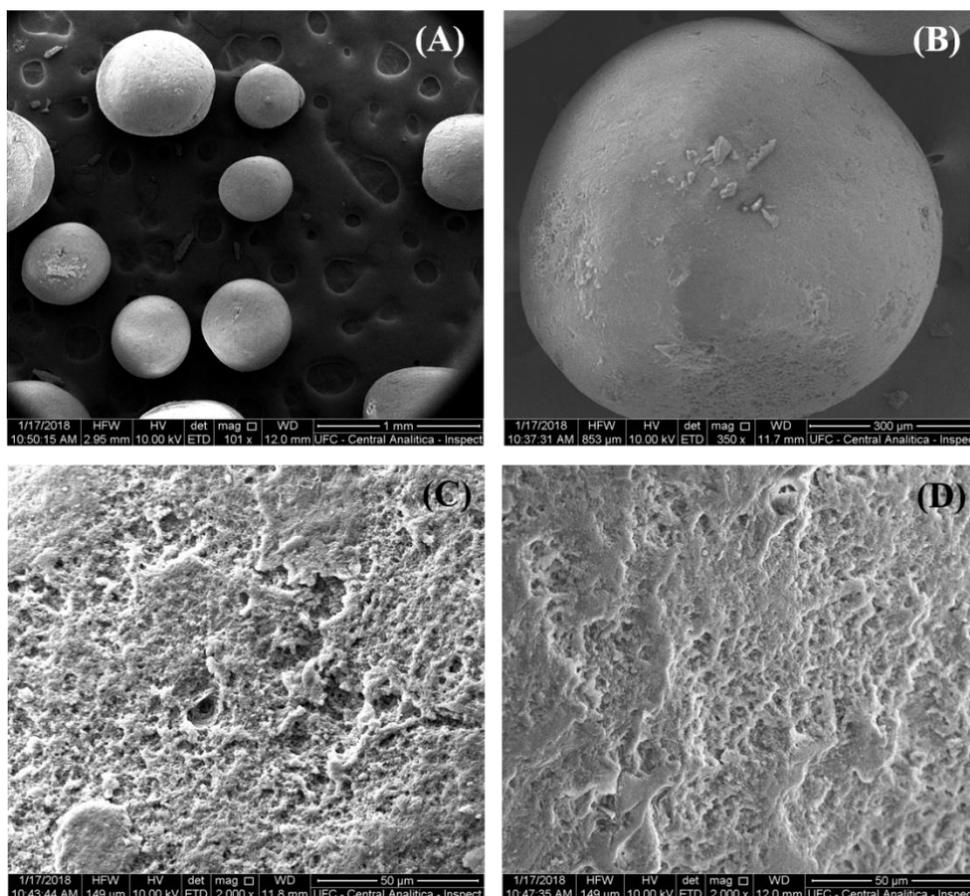
A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970), usando uma célula tetra-Miniprotein (Biorad), a concentração do gel de corrida foi de 12%, distribuído em uma zona de separação de 9 cm x 6 cm, e uma zona de concentração de 5% de poliacrilamida. Cem miligramas de amostras de enzimas foram suspensas em 1 mL de tampão de ruptura (2% de SDS e 10% de mercaptoetanol) e fervidos durante 10 minutos, em seguida, uma alíquota de 12 μ L do sobrenadante foi utilizada nos experimentos. Os géis foram corados com Azul de Coomassie e analisados pelo programa *Gel Analyzer*. Marcadores de baixo peso molecular foram utilizados (14,4-97 kDa).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização do suporte

As micrografias obtidas por MEV destacam as características morfológicas do Immobead-350. Nas Figuras 7A e 7B é possível visualizar o formato esférico e aproximadamente regular do suporte IB-350. Já a Figura 7C apresenta uma imagem aproximada do suporte, permitindo uma melhor visualização da sua superfície, a qual exibe deformações irregulares que penetram no interior do material, correspondendo aos poros do suporte. Após a imobilização com Lecitase (Figura 7D), verifica-se uma redução do número de poros devido à presença de agregados de proteína que recobrem a superfície do suporte, confirmando a presença da enzima imobilizada no IB-350.

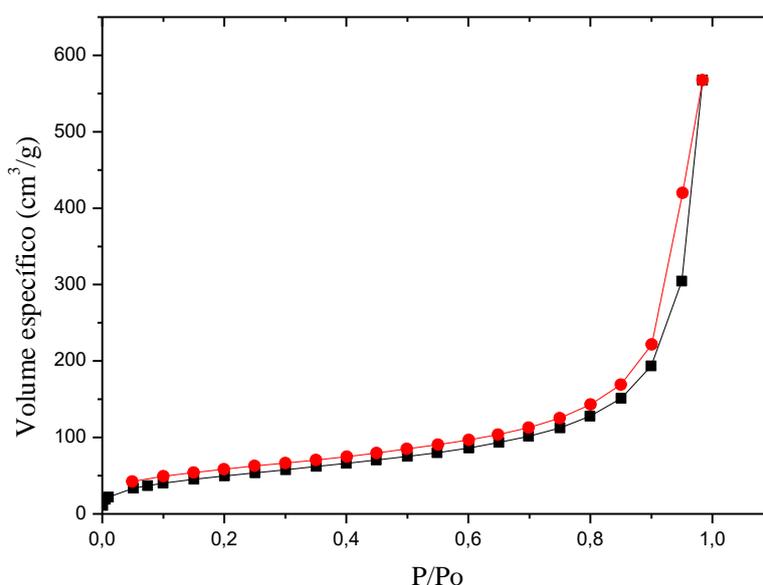
Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Varredura do suporte IB-350 (20 kV). (A): Suporte IB-350 (x 101); (B): Imagem aproximada de uma esfera do suporte (x 300); (C): Superfície do suporte sem enzima (x 2000); (D): Superfície do suporte com a enzima imobilizada (x 2000).



Fonte: Elaborada pela autora.

Para determinar as características textuais do Immobead-350, medidas de dessorção e adsorção do N₂ à 77 K foram realizadas. A isoterma de adsorção-dessorção do N₂ (Figura 8) é classificada como do tipo II, característica de materiais macroporosos. Além da classificação do tamanho dos poros do material, os dados obtidos pela isoterma de adsorção-dessorção permitem calcular a área superficial do material de acordo com o método Brunauer, Emmet e Teller (BET) e, partindo desse parâmetro, pode-se encontrar o volume total de poros do material e o diâmetro médio de poros.

Figura 8 - Isoterma de adsorção-dessorção do N₂ para o suporte Immobead-350. (■): adsorção, (■): dessorção.



Fonte: Elaborada pela autora.

Conforme a Equação 1, a área superficial determinada pelo método BET para o Immobead-350 é de 182,2 m²g⁻¹. Segundo Mateo et al. (2006), os suportes para imobilização multipontual devem apresentar uma grande superfície interna, a fim de ter uma boa congruência geométrica com a superfície da enzima.

O volume total de poros encontrado para esse suporte foi de 0,47 cm³g⁻¹, maior que o volume total de poros do Immobead-150 (0,37 cm³g⁻¹), que é classificado como um material mesoporoso (MATTE et al., 2017). Comparativamente, suportes como SBA-15 (sílica mesoporosa) e Accurel MP 1004 (propileno macroporoso) apresentaram volumes total

de poros de $0,83 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ (VILARRASA-GARCIA et al., 2015) e $2 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ (SALIS et al., 2008), respectivamente, maiores que o encontrado nesse trabalho. Por outro lado, macropartículas de quitosana obtiveram apenas $0,2 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ de volume total de poros (KLEIN et al., 2012), apresentando uma porosidade bem menor que a do IB-350.

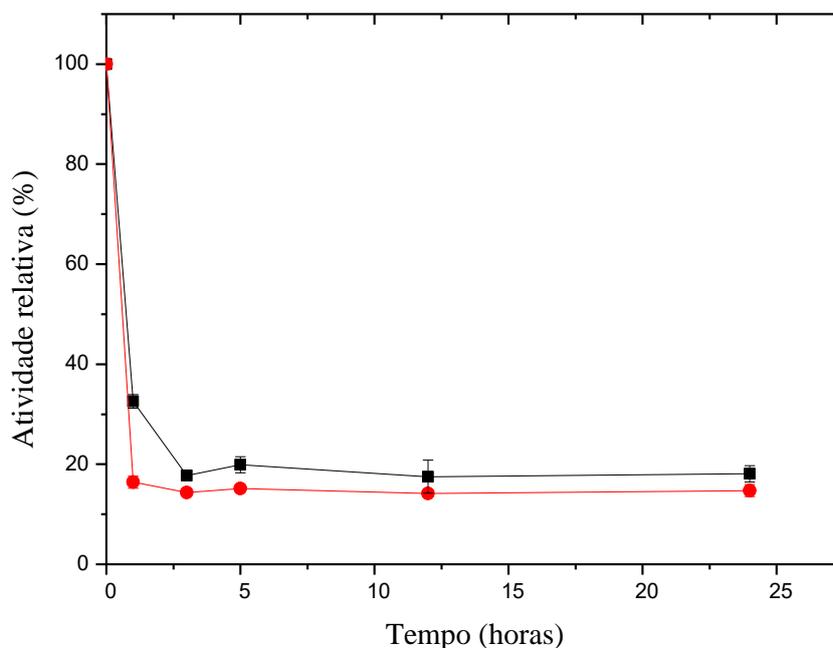
De acordo com Sing et al. (1985) poros com largura acima de 50 nm (500 Å) são denominados macroporosos. Assim, o valor de 51,1 nm encontrado para o diâmetro de poro do IB-350 confirma sua característica macroporosa. O ideal é que o diâmetro de poro dos suportes seja grande o suficiente para facilitar a difusão do substrato e do produto, além de permitir a entrada de novas moléculas de enzima, uma vez que elas são confrontadas com moléculas já imobilizadas, de forma a evitar o fechamento do poro. (HUDSON; COONEY; MAGNER, 2008; SANTOS et al., 2015b; VINU; MIYAHARA; ARIGA, 2005; WANG; WU; CHIANG, 1989).

2.3.2 Efeito do pH na imobilização enzimática

Os suportes epóxi-ativados são amplamente utilizados para imobilização de enzimas, uma vez que eles podem reagir com uma diversidade de grupos nucleófilos presentes na superfície da enzima (Lys, Tyr, His, Cys, Asp e Glu), além de possuírem natureza hidrofóbica, que facilita a imobilização de proteínas (MATEO et al., 2007c; MATTE et al., 2017). Dessa forma, a escolha do pH no processo de imobilização é considerada uma etapa crucial, desde que variações no estado de ionização podem resultar em diferentes reatividades dos aminoácidos de enzimas com os grupos epóxi presentes no suporte, determinando as interações finais enzima-suporte (RIOS et al., 2016; SANTOS et al., 2015d).

A Figura 9 a seguir exibe o curso de imobilização da Lecitase em IB-350 nos pHs 7 e 10. A partir da interpretação do gráfico, é possível observar que na imobilização a pH 7 houve uma redução de praticamente 100 % da atividade inicial em apenas 1 hora, enquanto a pH 10, a atividade remanescente atingiu valores mais baixos a partir de duas horas de imobilização, seguindo baixa durante 24 horas, para ambas as preparações. Assim, o período de 3 horas de imobilização a pH 7,0 foi escolhido para futuras preparações e estudo de um dos derivados desse trabalho (Leci-Ads), de modo que o menor tempo de imobilização favoreça apenas a adsorção física entre enzima e suporte. Os demais derivados foram preparados por imobilização a pH 10, durante 24 horas (Leci-CVL), e através da estratégia de dois passos de imobilização (Leci-2p) que será destacada adiante.

Figura 9 - Efeito do pH no curso de imobilização da Lecitase em Immobead-350, a 25 °C. Círculo vermelho: remanescente – tampão fosfato, pH 7 (25 mM), quadrado preto: remanescente – tampão bicarbonato, pH 10 (25 mM).



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 2 estão os resultados dos parâmetros de imobilização estudados nesse trabalho, a segunda preparação está representada por uma sequência de dois pHs (pH 7 → pH 10), essa nomenclatura se refere ao estudo da estratégia de imobilização por dois passos, onde, inicialmente, a enzima é imobilizada no suporte a pH 7, durante três horas, seguindo o mesmo protocolo da estratégia anteriormente explicada (Leci-Ads) e, em sequência, o derivado é incubado em tampão bicarbonato pH 10, 25 mM (o tempo de incubação também foi estudado e será avaliado no tópico 3.5 a seguir), referente à segunda etapa de imobilização. A adição desse passo pode ser explicada pela baixa reatividade dos grupos epóxi, tornando necessária uma primeira etapa de adsorção física da enzima no suporte, seguida da ligação covalente entre a proteína adsorvida e os grupos funcionais ao seu redor (MATEO et al., 2007c; MELANDER; CORRADINI; HORVÁTH, 1984; WHEATLEY; SCHMIDT, 1993, 1999).

De acordo com os parâmetros calculados na Tabela 2, os elevados rendimentos de imobilização das preparações confirmam que praticamente toda a enzima foi imobilizada no

suporte durante o tempo estudado. Com relação à atividade do derivado, o maior valor foi obtido na imobilização direto a pH 7,0 ($At_d = 16,13$ U/g), porém as demais preparações também apresentaram elevadas atividades.

A literatura relata a utilização de variadas estratégias de imobilização de enzimas em diferentes valores de pH (BEZERRA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2015a; GARCIA-GALAN et al., 2014; RIOS et al., 2016). De acordo com Rodrigues et al. (2009), há uma maior reatividade dos grupos amina presentes nos resíduos lisina na superfície externa da enzima quando esses estão desprotonados, levando a uma multi-interação com os grupos do suporte. Seguindo esse princípio, Matte et al. (2017) imobilizaram a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) no suporte IB-150 a pH 10,5 por 24 h, a fim de favorecer a ligação covalente multipontual entre enzima e suporte. Dhake et al. 2012 adotaram uma outra estratégia para imobilizar a *steapsin* lipase em IB-350, onde a enzima foi incubada a pH 7 no suporte por 4 horas.

Nesse caso, como os biocatalisadores preparados obtiveram atividades do derivado elevadas, e com valores próximos, ensaios de estabilidade térmica e em solvente foram realizados para testar a eficiência do protocolo de imobilização.

Tabela 2 - Parâmetros de imobilização da Lecitase imobilizada em diferentes pHs (7 e 10 – 25 mM) no suporte Immobead-350, 25 °C, por 24 horas.

pH de imobilização/ 25°C	At_i (U/g)	At_f (U/g)	At_d (U/g)	RI (%)
pH 7	$138,3 \pm 1,7$	$22,7 \pm 2,7$	$16,1 \pm 0,2$	83,5
pH 7 → pH 10	$138,3 \pm 1,7$	$22,7 \pm 2,7$	$15,4 \pm 0,2$	83,5
pH 10	$148,3 \pm 1,2$	$27,6 \pm 3,1$	$14,6 \pm 0,2$	80,6

Fonte: Elaborada pela autora.

At_i : Atividade inicial

At_f : Atividade final

At_d : Atividade do derivado

RI: Rendimento de Imobilização

2.3.3 Efeito da presença de diferentes detergentes na imobilização

A estratégia de imobilização na presença de diferentes detergentes foi testada apenas com o derivado Leci-CVL, visto que os outros biocatalisadores possuem uma etapa de adsorção física durante a imobilização. Nesses casos, o uso de detergentes pode remover a

enzima do suporte hidrofóbico e impedir a imobilização por ativação interfacial (GARCIA-GALAN et al., 2014; HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

A Tabela 3 mostra que a Lecitase imobilizada na presença de Triton X-100 exibiu uma hiperativação em relação à imobilização da enzima na ausência de detergente. Na concentração de 0,01 % de Triton X-100, próxima a CMC, a atividade do derivado ($At_D = 16,7$ U/g) alcançou um aumento de quase duas vezes em relação à atividade do derivado sem detergente ($At_D = 10,1$ U/g). Quando a concentração de Triton X-100 subiu para 0,1 % (acima da CMC), a atividade do derivado apresentou uma queda moderada ($At_D = 14,7$ U/g), porém ainda se manteve 1,3 vezes mais alta que na ausência de detergente.

Esses resultados sugerem que o uso de surfactantes dispõem de algumas vantagens para o processo o processo de imobilização, uma vez que eles evitam a formação de dímeros entre moléculas de enzima e podem induzir mudanças conformacionais em sua estrutura, permitindo que os grupos hidrofóbicos anteriormente confinados se tornem expostos, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da lipase (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007b; PALOMO et al., 2003, 2004, 2005).

Tabela 3 - Parâmetros de imobilização da Lecitase no suporte IB-350, na ausência e presença de detergente. Imobilização em tampão bicarbonato pH 10,0 (25 mM), 25 °C.

	At_i (U/g)	At_f (U/g)	At_d (U/g)	RI (%)
Sem detergente	99,6 ± 2,1	15,1 ± 0,5	10,1 ± 0,8	84,9
Triton X-100 0,1 %	47,4 ± 8,3	10,1 ± 1,4	14,3 ± 0,1	78,7
Triton X-100 0,01 %	137,7 ± 0,7	16,5 ± 1,1	16,7 ± 0,2	88,0
SDS 0,1 %	18,3 ± 1,1	13,7 ± 4,3	1,8 ± 0,1	25,2
SDS 0,01 %	194,6 ± 4,4	16,5 ± 1,1	12,4 ± 0,4	91,5

Fonte: Elaborada pela autora.

At_i : Atividade inicial

At_f : Atividade final

At_d : Atividade do derivado

RI: Rendimento de Imobilização

Com relação à imobilização na presença de SDS (concentrações abaixo da CMC), os resultados não foram tão satisfatórios quando comparados ao Triton X-100, a atividade do biocatalisador na concentração de 0,01 % apresentou um aumento moderado em relação a atividade sem detergente, enquanto que na concentração de 0,1 % houve um decréscimo acentuado da atividade do derivado ($At_D = 1,78$ U/g). Além disso, o rendimento de

imobilização apresentou um valor muito baixo (25,21 %), indicando que a imobilização da enzima nessas condições não foi eficiente. Uma explicação para essa redução de atividade é que os detergentes podem promover tanto a hiperativação da enzima, por estabilizar sua conformação aberta, como também a inativação, levando à distorção da estrutura da proteína ou à inibição da atividade enzimática. (GARCIA-GALAN et al., 2014; HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

Em termos de atividade de enzima livre, valores muito baixos foram alcançados em concentrações elevadas de Triton X-100 e SDS 0,01 %, quando comparada à atividade da enzima solúvel sem detergente e na concentração de 0,01 %. Nessas condições, um outro fator que explica a queda na atividade pode estar relacionado a formação de micelas em altas concentrações de detergente (acima da Concentração Micelar Crítica - CMC), esse fenômeno pode afetar a disponibilidade do substrato no meio, reduzindo assim a atividade da enzima (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007b). Os valores de CMC estão na tabela 9 do ANEXO A.

Fernandez-lorente et al. (2007b) estudaram o efeito da presença de detergentes na imobilização de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) imobilizada em glioxil agarose, os melhores resultados foram obtidos com os detergentes não-iônicos (Triton X-100 e Triton X-45) em concentrações acima da CMC. No caso do Triton X-100, a atividade do biocatalisador aumentou 3,7 vezes na concentração 0,1%. Usando o detergente catiônico SDS, as atividades apresentaram valores maiores em concentrações abaixo da CMC, apenas um pequeno aumento na atividade foi observado em concentrações mais baixas, assim como nesse trabalho. De acordo com Garcia-galan et al. (2014), a atividade da Lecitase imobilizada no suporte octyl aumentou 120% usando SDS 0,01 %, enquanto que na concentração de 0,1 % a atividade caiu para 60 %.

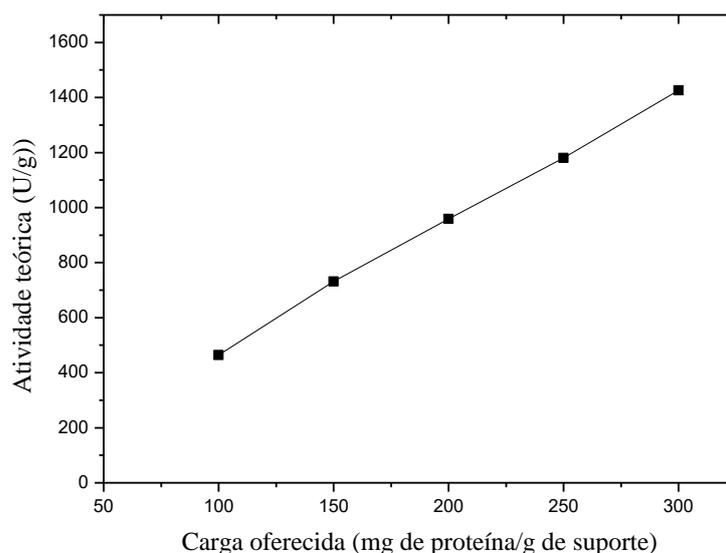
2.3.4 Ensaio de carga máxima

Analisando os dados da Figura 10 e 11, é possível observar um aumento da atividade oferecida (Figura 10) e da atividade teórica (Figura 11) de imobilização à medida que uma maior quantidade de proteína é oferecida, e essa tendência se mantém até a carga de 300 mg de proteína/g de suporte. Esses resultados indicam que a carga máxima do suporte IB-350 ainda não foi atingida, ou seja, é superior a 300 mg de proteína/g de suporte, valor máximo testado nesse ensaio.

É importante ressaltar que esse estudo foi realizado na tentativa de atingir a carga máxima de imobilização, porém como cargas acima de 300 mg de proteína/g de suporte requerem uma grande quantidade de enzima oferecida para imobilização e um alto volume de proteína já havia sido utilizado neste ensaio, decidiu-se parar o experimento na carga de 300 mg de proteína/g de suporte, uma vez que não foram utilizadas cargas superiores a 100 mg/g para os ensaios realizados nesse trabalho.

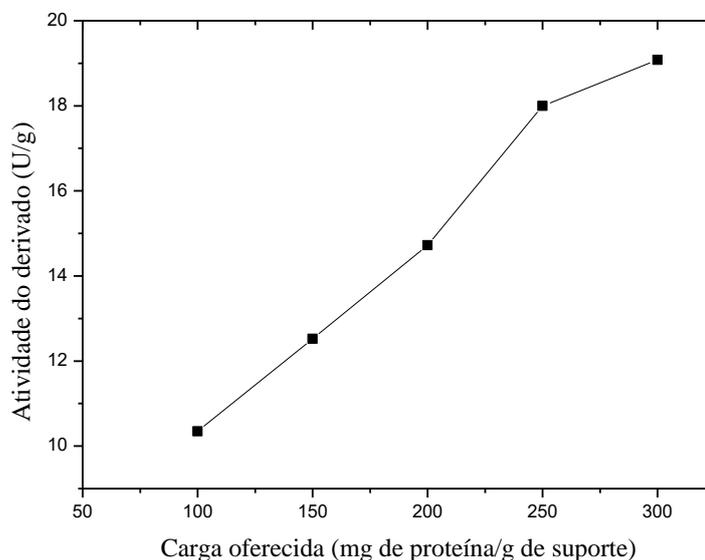
Contudo, os resultados obtidos confirmam o grande tamanho de poro do suporte (51,1 nm), que permitiu a imobilização de uma elevada carga de proteína (300 mg/g), sem atingir o valor máximo de carregamento, indicando que seus poros e superfície ainda não estão completamente preenchidos com moléculas de enzima. Dados da literatura permitem comparar a capacidade de carregamento entre os suportes IB-350 e IB-150. Matte et al. (2017) variaram a carga de enzima oferecida (TLL) entre os valores de 10 a 150 mg/g de suporte (IB-150), os resultados indicaram que os maiores rendimentos de imobilização foram observados utilizando baixas concentrações de proteína. Essa diferença na capacidade de carregamento entre os suportes IB-150 e IB-350 é explicada pelo tamanho do poro, que é muito menor no IB-150 (10-20 nm).

Figura 10 - Gráfico de carga de proteína oferecida (mg/g de suporte) versus Atividade Teórica (U/g). As cargas oferecidas variaram de 100 a 300 mg de proteína /g de suporte. A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 - Gráfico de carga de proteína oferecida (mg/g de suporte) versus Atividade do derivado (U/g). As cargas oferecidas variaram de 100 a 300 mg de proteína /g de suporte. A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM).



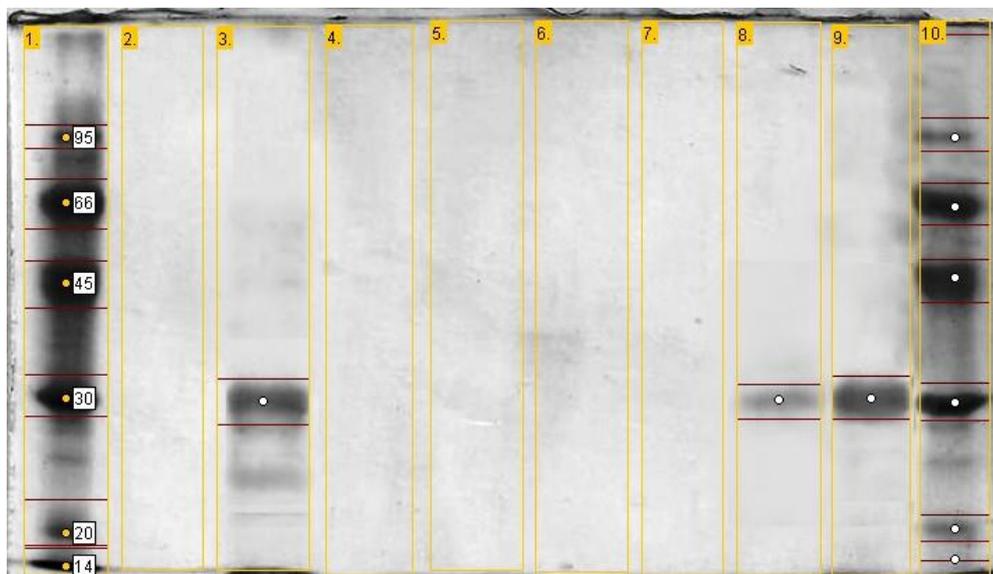
Fonte: Elaborada pela autora.

2.3.5 SDS-PAGE

A análise de eletroforese (SDS-PAGE) foi realizada com o intuito de testar os tipos de ligação entre enzima e suporte formados durante os dois passos de imobilização. Além disso, foi possível estimar o peso molecular da Lecitase (Tabela 10 - Anexo I). Na Figura 13 é possível visualizar as faixas desse ensaio.

As faixas 4, 5, 6 e 7 correspondem aos derivados incubados em tampão bicarbonato pH 10 nos tempos de 1 h, 5 h, 18 h e 24 h, respectivamente. A ausência de bandas bem definidas nessas faixas indica que não foram detectadas proteínas nas mesmas. Esses resultados confirmam que o segundo passo de imobilização foi eficiente na formação da ligação covalente, porque mesmo após adição do tampão de ruptura (contendo SDS) na amostra, seguido de incubação a 100 °C por 10 min, nenhuma enzima foi liberada do suporte, indicando que uma forte ligação entre enzima e suporte prevaleceu.

Figura 12 - Análise de SDS-PAGE. Os experimentos foram realizados como descrito na Secção 4.2.8.8. Faixa 1: marcador de baixo peso molecular, Faixa 3: enzima livre, Faixa 4: derivado – 1 hora de incubação, pH 10, Faixa 5: derivado – 8 horas de incubação, Faixa 6: derivado – 16 horas de incubação, Faixa 7: derivado – 24 horas de incubação, Faixa 8 – imobilização direto a pH 10, Faixa 9: imobilização direto a pH 7, Faixa 10: marcador de baixo peso molecular. Edição feita pelo programa Gel Analyzer.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na faixa 8, correspondente ao derivado Leci-CVL, apenas traços de proteína foram encontrados, dessa forma é possível afirmar que a imobilização por ligação covalente também foi bem sucedida, assim como nos derivados Leci-2p. A banda com tonalidade fraca (faixa 10) corresponde a remanescentes de enzimas que se ligaram ao suporte de forma não reversível, ou seja, por meio de interações fracas.

A faixa 9 é referente ao derivado que foi apenas imobilizado em tampão fosfato pH 7, sem incubação em pH 10 e, ao contrário das anteriormente discutidas, essa faixa exibiu uma banda bem visível, que confirma a adsorção interfacial da enzima ao suporte, nesse passo de imobilização. Isso pode ser explicado pelo fato de que as forças físicas envolvidas na adsorção geralmente são fracas e algumas das proteínas adsorvidas podem se desorver do suporte quando em condições de alta força iônica, elevada concentração de detergente ou temperaturas altas (BEZERRA et al., 2015). De abreu et al. (2014) relatam que o Immobead é um polímero acrílico macroporoso adequado para a imobilização covalente de uma variedade de enzimas (BABICH et al., 2012), embora exiba uma característica hidrofóbica que o

permite ser um possível suporte para imobilização via adsorção interfacial. A tabela 1 no ANEXO A mostra os pesos moleculares das bandas que aparecem em suas respectivas faixas.

2.3.6 Estabilidade térmica e em solvente

A fim de avaliar os melhores tempos de incubação dos biocatalisadores preparados, foram realizados ensaios de estabilidade em diferentes condições de temperatura e na presença do solvente orgânico (acetonitrila 30%). O derivado Leci-Ads apresentou elevados tempos de meia-vida, sendo mais estável que Leci-CVL em praticamente todas as condições testadas. Em condições mais severas, como incubação em pH 10 e na presença de acetonitrila 30 %, Leci-Ads foi 1,1 e 4,4 vezes mais estável que Leci-CVL, respectivamente. Nesse caso, o longo tempo de imobilização da enzima direto a pH 10 pode ter provocado distorções na sua estrutura (SUN et al., 2010). O método de adsorção física, que é caracterizado pela formação de interações fracas entre enzima e suporte durante tempos curtos de imobilização, pode ser mais eficiente, em alguns casos, devido à ruptura mínima da estrutura das enzimas imobilizadas, uma vez que pode ocorrer uma natural desnaturação da enzima em longos tempos de contato (LI et al., 2009; RIOS et al., 2017; SUN et al., 2010).

Tabela 4 - Tempos de meia-vida (expresso em minutos) da Lecitase imobilizada em IB-350, sob diferentes condições de inativação. A atividade foi medida através da hidrólise do *p*-NPB (50 mM). Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.

Amostras	Condições de inativação			
	pH 5,0 (25mM)- 50°C	pH 7,0 - 50°C	pH 10 - 50°C	Acetonitrila 30% - 25°C
Leci-Ads	184,8 ± 7,1	106,6 ± 7,9	21,6 ± 1,1	84,5 ± 2,1
Leci-CVL	190,2 ± 10,2	96,2 ± 2,1	18,7 ± 0,7	29,0 ± 1,7
Leci-2p (1 h/pH10)	102,1 ± 5,6	53,4 ± 2,7	55,4 ± 3,4	102 ± 9,5
Leci-2p (8 h/pH10)	85,7 ± 7,8	60,6 ± 5,2	52,4 ± 3,5	84,9 ± 7,2
Leci-2p (16 h/pH10)	83,9 ± 6,1	60,2 ± 4,4	46,8 ± 2,2	82,3 ± 8,1
Leci-2p (24 h/pH10)	127,7 ± 4,3	88,7 ± 5,7	61,9 ± 5,1	198,0 ± 12,2

Fonte: Elaborada pela autora.

O derivado Leci-2p (24 h/pH10) apresentou elevados tempos de meia-vida em todas as condições e, no geral, pode ser considerado o biocatalisador mais estável frente aos demais. Ao contrário do derivado Leci-CVL, o tempo de incubação de 24 horas possibilitou um ligação covalente multipontual mais efetiva, estabilizando a estrutura tridimensional da enzima e melhorando a sua estabilidade pela forte interação com o suporte (LIMA et al., 2015a). Como o suporte e a enzima são estruturas bastante rígidas é necessário que ocorra o alinhamento correto para obter uma intensa ligação covalente multipontual (RODRIGUES et al., 2013a). Esse tipo de ligação é eficaz na estabilização de enzimas, pois os grupos envolvidos na imobilização mantêm as suas posições relativas inalteradas durante as mudanças conformacionais induzidas por agentes de distorção (DOS SANTOS et al., 2015; GIANFREDA; SCARFI, 1991; MATEO et al., 2007b).

Nesse estudo, a estratégia dois passos de imobilização (Leci-2p) permitiu uma otimização do processo, desde que a enzima foi inicialmente adsorvida no suporte, por um tempo rápido, em seguida, o biocatalisador foi incubado a pH 10 (testando diferentes tempos) apenas para formar a ligação covalente multipontual entre a enzima já adsorvida e os grupos funcionais do suporte ao seu redor (MATEO et al., 2007c). Assim, essa estratégia formou um biocatalisador mais estável que o derivado Leci-CVL, que seguiu apenas uma etapa de imobilização. Leci 2p (24 h/pH10) apresentou tempos de meia-vida 3,3 e 6,8 vezes maiores que Leci-CVL na temperatura de 50 °C (pH 10) e na presença de acetonitrila 30 %, respectivamente.

2.4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, verificou-se que o Immobead-350 apresenta aspectos relevantes para imobilização de enzimas, como elevada área superficial ($182,2 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) e grande diâmetro de poro ($0,47 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$). Os biocatalisadores estudados apresentaram elevada atividade e rendimento de imobilização, indicando que as estratégias de imobilização testadas foram eficientes em formar derivados ativos.

O uso de surfactantes melhorou a atividade do biocatalisador Leci-CVL, porém o detergente Triton X-100 na concentração de 0,01% promoveu uma maior hiperativação da enzima ($16,7 \text{ U/g}$). Com relação ao ensaio de inativação térmica e na presença de solvente orgânico, todos os derivados se mostraram estáveis nas diferentes condições estudadas, contudo alguns derivados exibiram maiores tempos de meia-vida em relação aos demais, como Leci-Ads, que foi mais estável na temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (pH 5,0 e 7,0), enquanto Leci-2p (24h de incubação – pH 10) apresentou os maiores tempos de meia vida na condição de $50 \text{ }^\circ\text{C/pH10}$ ($t_{1/2} = 61,9 \text{ min}$) e na presença de acetonitrila 30 % ($t_{1/2} = 108,0 \text{ min}$).

RESULTADOS 2

*Efeito das modificações químicas do suporte Immobead-350
nas propriedades catalíticas de Lecitase Ultra.*

RESUMO

A estratégia de imobilização de enzimas tem sido cada vez mais requerida para os processos biocatalíticos industriais, devido as vantagens inerentes à utilização desses biocatalisadores, como possibilidade de recuperação, reuso e melhoria das propriedades enzimáticas. Nesse trabalho, a Lecitase Ultra foi imobilizada em diferentes preparações do suporte Immobead-350 (ativado com grupos epóxi, aldeído, divinilsulfona e glutaraldeído e através de cross-linking em suporte ativado com grupos epóxi e aldeído), a fim de testar e comparar a eficiência dos biocatalisadores preparados em diversos ensaios. Inicialmente, o tempo e os parâmetros de imobilização foram determinados, o derivado Leci-GLU apresentou a maior atividade do derivado (17,39 U/g) no tempo de 3 horas. Durante o reuso, os biocatalisadores se mostraram muito eficientes, uma vez que após 10 ciclos consecutivos de reação a atividade permaneceu 100 %. Quanto à estabilidade de estocagem, todos os derivados mantiveram cerca de 80 % da atividade inicial após 30 dias de armazenamento à 4 °C, exceto Leci-DVS que reduziu 50 % da atividade inicial após esse período. Em relação à estabilidade térmica e em solvente, Leci-GLU foi o derivado mais estável e obteve os maiores tempos de meia-vida tanto na temperatura de 65 °C ($t_{1/2} = 1,9$ h) quanto na presença de acetonitrila 30 % ($t_{1/2} = 42,6$ h). No estudo de atividade dos biocatalisadores versus diferentes substratos, o derivado mais ativo na reação de hidrólise do mandelato de metila (isômero R) foi Leci-crossA (28,4 U/mg), a pH 7. A maioria dos derivados testados tiveram preferência pelo isômero S, exceto Leci-GLU. Os biocatalisadores também participaram da síntese enzimática do acetato de benzila, um composto bastante utilizado na indústria de perfumaria, química e de alimentos. Nesse ensaio, o derivado com maior atividade foi Leci-GLU (2,1 U/mg). De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que os métodos de imobilização foram efetivos na preparação de biocatalisadores estáveis e capazes de catalisar diferentes reações, incluindo a síntese de um produto de interesse industrial, contudo alguns derivados (Leci-crossA, Leci-crossE e Leci-GLU) apresentaram um melhor desempenho em relação aos demais.

Palavras-chave: Biocatalisadores, imobilização, Lecitase e estabilidade.

3 INTRODUÇÃO

A imobilização enzimática tem sido um requerimento indispensável na área de processos biocatalíticos (BRADY; JORDAAN, 2009; DOS SANTOS et al., 2015c), desde que o emprego dessa técnica permite a recuperação e o reuso do biocatalisador (BEZERRA et al., 2017), facilita a separação do produto e viabiliza o seu uso em processos contínuos (BARBOSA et al., 2013). Contudo, a obtenção de um biocatalisador com propriedades interessantes para aplicação industrial exige requerimentos que devem ser cuidadosamente considerados, fatores como o tipo de ligação envolvida e a escolha adequada do suporte de imobilização devem ser estrategicamente selecionados a fim de melhorar a estabilidade, atividade e seletividade da enzima imobilizada (BARBOSA et al., 2013; BEZERRA et al., 2015; MATEO et al., 2007a).

Uma estratégia que vem sendo bastante utilizada para imobilização de enzimas é a ligação covalente multipontual, porque ela permite a rigidificação da estrutura da enzima no suporte, estabilizando os grupos envolvidos na imobilização e evitando mudanças conformacionais na estrutura da proteína (DOS SANTOS et al., 2015; GIANFREDA; SCARFI, 1991; MATEO et al., 2007b). Alguns suportes são relatados como eficientes para obter tais ligações, como os funcionalizados com grupos epóxi, glutaraldeído e divinilsulfona (BEZERRA et al., 2015, 2017; DOS SANTOS et al., 2015c; RIOS et al., 2016). Assim, a utilização de cada um deles exige um protocolo de imobilização adequado para as particularidades que os grupos ativos da enzima e do suporte exibem. Suportes epóxi-ativados são matrizes de imobilização bastantes estáveis, podendo ser armazenadas por longos períodos em pH neutro. Além disso, eles podem reagir com uma vasta gama de grupos proteicos como amino, tiol, imidazol, fenol e carboxil (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; MATTE et al., 2017). Os suportes ativados com divinilsulfona podem promover uma intensa ligação covalente multipontual em condições específicas de imobilização, desde que os grupos vinil sulfona são muito reativos e podem interagir com uma diversidade de grupos das proteínas, como amino, fenol, imidazol ou tiol (DOS SANTOS et al., 2015c; RIOS et al., 2016).

Em adição aos grupos funcionais acima mencionados, suportes funcionalizados com glutaraldeído são bastante interessantes devido à sua versatilidade, uma vez que eles oferecem diferentes grupos de ligação que podem interagir com a enzima, como porções hidrofóbicas, iônicas e covalentes (BARBOSA et al., 2012, 2014; RIOS et al., 2016). Outro

aspecto interessante do glutaraldeído é que ele pode ser utilizado para reticular moléculas de enzimas imobilizadas em qualquer tipo de suporte. A adição desse reagente permite a formação de *cross-linking* entre as enzimas, que são favorecidas quando elas estão próximas umas das outras (BARBOSA et al., 2012, 2014).

Nesse trabalho, a Lecitase Ultra foi escolhida para o estudo de imobilização no suporte Immobead-350 modificado com diferentes grupos químicos (IB-350). Essa enzima pertence à classe das fosfolipases A1 e é uma preparação comercial obtida da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e da fosfolipase de *Fusarium oxysporum* (ALVES et al., 2015; MISHRA et al., 2009). Uma peculiaridade da enzima engenheirada é que ela possui a estabilidade da lipase de *T. lanuginosus* e a atividade da fosfolipase de *F. oxysporum* (GARCIA-GALAN et al., 2014). A Lecitase Ultra foi desenvolvida principalmente para ser utilizada na degomagem de óleos, mas suas aplicações se estendem desde a resolução de intermediários enantiomericamente puros (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007a; GARCIA-GALAN et al., 2014) à esterificação de resíduos alimentares em monoacilgliceróis (GONÇALVES et al., 2013).

O suporte Immobead-350 é um polímero acrílico macroporoso, funcionalizado com grupos epóxi, ideal para imobilização covalente de enzimas (DE MATOS, 2014; DHAKE et al., 2012; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009). Ligantes epóxis podem reagir com diferentes grupos nucleófilos presentes na superfície da proteína, como mencionado anteriormente, eles também são caracterizados por possuir um curto braço espaçador, que permite uma maior rigidificação da estrutura das moléculas de enzimas imobilizadas (MATEO et al., 2007c; TURKOVÁ et al., 1978). A natureza macroporosa do IB-350 é outro aspecto atraente desse suporte, porque permite a formação de biocatalisadores com alta carga enzimática, além de facilitar a difusão do substrato e produto dentro dos poros do suporte (SANTOS et al., 2015b).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver novas e diferentes estratégias de modificação do suporte Immobead-350, utilizando diferentes reagentes funcionais e, em seguida, imobilizar a Lecitase Ultra nos suportes ativados, a fim de avaliar e comparar o efeito das modificações químicas nas propriedades dos biocatalisadores quanto à estabilidade e a versatilidade frente à catálise de dois diferentes substratos. Nesse último ensaio, os biocatalisadores participaram da reação de hidrólise do mandelato de metila e da acetilação do álcool benzílico para formação do composto acetato de benzila, também

conhecido como aroma de jasmim, um produto com ampla utilização na indústria de perfumaria e detergentes.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 *Materiais*

A enzima engenheirada Lecitase Ultra (15,49 mg/mL) foi obtida da Novozymes (Espanha). O suporte Immobead-350 foi fornecido pela empresa Chiral Vision®. Todos os outros reagentes empregados foram obtidos de grau analítico.

3.2 Métodos

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como a média destes valores e o desvio padrão (geralmente abaixo de 10 %).

3.2.1 *FTIR*

A análise de FTIR foi realizada para investigar as modificações do suporte IB-350. Os espécimes foram previamente diluídos em KBr e, então, os espectros de infravermelho de Transformação de Fourier (FTIR) foram registrados utilizando o equipamento FT-IR FT-IR 8300 (Shimadzu Inc., Tóquio, Japão), na faixa de 400-4000 cm^{-1} . Esta avaliação foi realizada em triplicado ($n = 3$).

3.2.2 *Modificação do Suporte IB-350*

3.2.2.1 *Pré-tratamento e adição de grupos aldeído*

A fim de retirar o ar aprisionado de dentro das esferas de Immobead-350 (IB-350) realizou-se um procedimento de hidratação do suporte, onde 2 g de IB-350 foram tratados com 25 mL de etanol (95%) por 4h, a 25 °C. Ao longo desse tempo, as esferas de IB-350 foram cuidadosamente decantadas. Em seguida, o suporte foi filtrado e lavado 4 a 5 vezes com água destilada (20 mL) e então equilibrado em tampão fosfato de sódio (25 mM - pH 7,0). A metodologia foi modificada de Dhake et al. (2012).

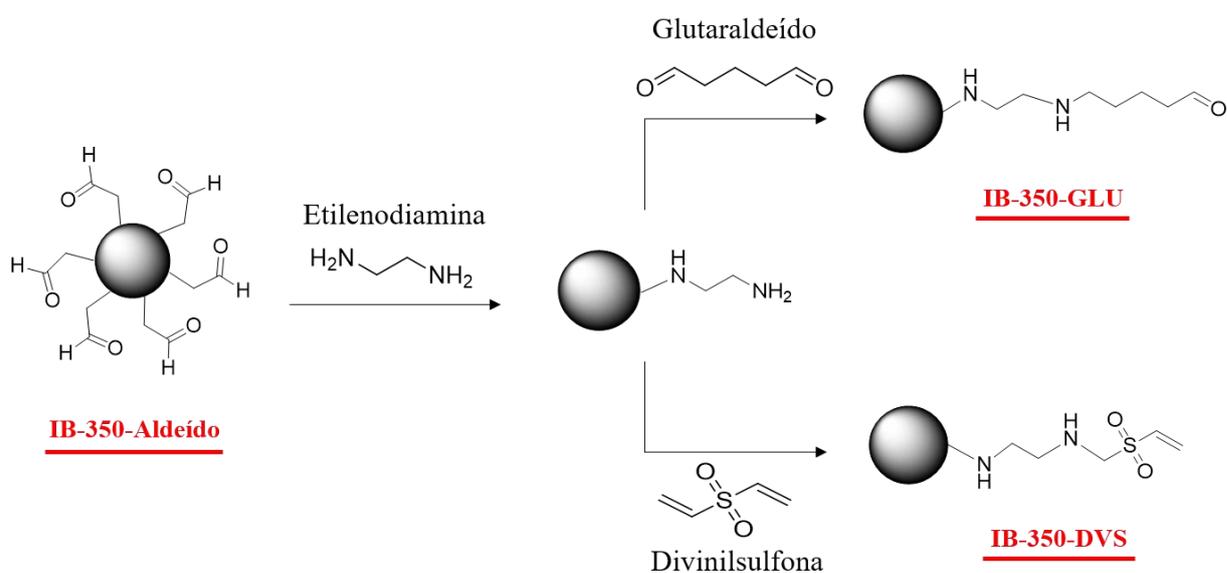
Para o procedimento de hidrólise dos grupos epóxi e introdução das unidades aldeído, utilizou-se a metodologia descrita por Alagoz et al. (2016), com algumas

glutaraldeído, sob agitação moderada, durante 15 h a 25 °C. Finalmente, o suporte resultante foi lavado 5 vezes com tampão fosfato (5 mM e pH 7) para remover o excesso de glutaraldeído. A preparação final foi denominada IB-350-EDA-GLU. A representação esquemática da ativação com GA pode ser visualizada na Figura 14.

3.2.2.4 Ativação com divinilsulfona (DVS)

A ativação de IB-350-EDA com DVS foi realizada suspendendo 1 g de suporte em 10 mL de solução tampão (200 mM) contendo divinilsulfona 15 % (v/v) (DOS SANTOS et al., 2015b). Os experimentos foram realizados durante 35 min a 25 °C. Posteriormente, a mistura foi lavada com água destilada em abundância e armazenada a 4 °C. O suporte foi denominado IB-350-EDA-DVS. A representação esquemática da ativação com DVS pode ser visualizada na Figura 14.

Figura 14 - Representação esquemática da ativação do suporte IB-350-Aldeído com EDA, seguido da adição de grupos glutaraldeído ou divinilsulfona.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.3 Imobilização enzimática

3.2.3.1 Imobilização covalente via grupos epóxi

O processo de imobilização da Lecitase em Immobead-350 comercial, já ativado com grupos epóxi, foi através de um mecanismo de dois passos. Inicialmente, 1 g do suporte foi suspenso em 10 mL de solução enzimática (concentração máxima de proteína de 10 mg/mL) na presença de tampão fosfato de sódio, 25 mM, a 25 °C, durante um período de 3 h. Após essa etapa, o derivado foi ressuspensionado em tampão bicarbonato de sódio 25mM (razão 1:10 m/v) por 24 horas. Posteriormente, o derivado final foi incubado em solução de EDA 1M (pH 10) por 18 horas, a 25 °C (DOS SANTOS et al., 2015a). Essa etapa final é necessária para que o EDA promova o bloqueio de alguns agentes reativos que podem interagir com a enzima, causando alterações conformacionais. O derivado foi denominado Leci-2pE.

3.2.3.2 Imobilizações por adsorção

Um total de 1 g de suporte foi ressuspensionado em 10 mL de soluções enzimáticas (concentração máxima de proteína de 10 mg/mL), preparadas em tampão fosfato de sódio (pH 7 - 25 mM) a 25 °C, sob agitação suave durante 2 h. Após a imobilização, as preparações enzimáticas foram lavadas com tampão fosfato de sódio 25 mM - pH 7 para eliminar qualquer proteína remanescente que não tenha se ligado ao suporte. Os derivados foram denominados Leci-adsE, quando imobilizadas em grupos epóxi, e Leci-adsA, quando imobilizadas em grupos aldeídos.

3.2.3.3 Adsorção seguida de cross-linking

Esse procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Matte *et al.*, (2014). A princípio, 1 g dos derivados preparados por adsorção (Leci-adsE ou Leci-adsA) foram tratados com 2 mL de uma solução de glutaraldeído 1 % (v/v) em tampão fosfato de sódio (0,1 M - pH 7), seguido de agitação suave durante 1 h. Esse tratamento permitiu modificar completamente os grupos amino primários da enzima e o suporte com apenas uma molécula de glutaraldeído. Após a imobilização, as preparações enzimáticas foram lavadas com fosfato de sódio 0,1 M pH 7 para remover o excesso de glutaraldeído. As preparações

foram denominadas Ecross, quando imobilizadas em grupos epoxi e Across, quando imobilizadas em grupos aldeídos.

3.2.3.4 Imobilização em IB-350-GLU

A imobilização da Lecitase em IB-350-GA produziu o biocatalisador denominado Lec-IB-350-GA. Para essa finalidade, 10 mL de solução enzimática preparada em tampão fosfato 25 mM (pH 7,0), na presença de Triton X-100 0,01 %, foi misturada com 1 g de suporte e mantida sob agitação lenta durante 3 h a 25 ° C. Após esse passo, borohidreto de sódio (1,0 mg/mL) foi adicionado a suspensão de imobilização, durante 30 min a 25 °C, para promover a redução das bases de Schiff (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993).

3.2.3.5 Imobilização em IB-350-DVS

A imobilização da Lecitase em IB-350-DVS produziu o biocatalisador denominado Lec-IB-350-DVS. Para esse propósito, 1 g de suporte foi adicionado a 10 mL de tampão bicarbonato 25 mM (pH 10,0), contendo solução enzimática e Triton X-100 na concentração de 0,01 %, a mistura foi mantida sob agitação lenta durante 3 h a 25 °C. Após a imobilização, as bases de Schiff foram reduzidas com borohidreto de sódio (1,0 mg/mL), como descrito no 3.2.2.4.

3.2.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima solúvel ou suspensão foi determinada através da hidrólise do substrato *p*-nitrofenol buritaro (*p*-NPB) 50 mM em acetonitrila, liberando o *p*-nitrofenol como produto. O *p*-nitrofenol foi quantificado por um espectrofotômetro (Thermo Scientific®) com comprimento de onda de 348 nm (fator da curva de calibração do *p*-nitrofenol = 0,1912, sob estas condições), em que uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de *p*-NPB por minuto a 25 °C, pH 7.

A concentração de proteína foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Albumina Bovina Cristalina (BSA) foi utilizada como padrão para construir a curva de calibração.

3.2.5 Estabilidade térmica

Para verificar o efeito da temperatura sobre a estabilidade dos derivados, suspenderam-se 0,1 g do biocatalisador em 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,025 M, pH 7) a 65 °C. Amostras foram retiradas periodicamente e a atividade foi medida usando *p*-NPB como substrato. Meia-vidas foram calculadas utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (SADANA; HENLEY, 1987).

3.2.6 Estabilidade em solvente

Para determinar a estabilidade em solvente, a Lecitase solúvel e imobilizada foi incubada em solução 30 % de acetonitrila/70 % de tampão Tris HCl 100 mM, a pH 7. Periodicamente, as amostras foram retiradas e a atividade foi medida utilizando o *p*-NPB. Os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) também foram determinados pelo modelo citado no tópico 2.3.4.

3.2.7 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos biocatalisadores produzidos foi realizada através da hidrólise do *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) em repetidos ciclos de reação nas mesmas condições. Na reação, utilizaram-se 25,5 mL de tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7) e 0,5 mL de *p*-NPB foram colocados em contato com 150 mg do biocatalisador. O sistema foi mantido sob agitação por 12 minutos a 25 °C.

3.2.8 Estabilidade de estocagem

Na estabilidade de estocagem, 2 g de cada derivado foram armazenados a 4 °C. A atividade foi medida no dia da preparação de cada biocatalisador e periodicamente ao longo dos dias de estocagem. As medidas foram realizadas através da hidrólise do *p*-NPB, conforme o tópico 2.2.3.

3.2.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com (LAEMMLI, 1970), usando uma célula tetra-Miniprotean (Biorad), a concentração do gel de corrida foi de 12%, distribuído em uma zona de separação de 9 cm x 6 cm, e uma zona de concentração de 5% de poliacrilamida. Cem miligramas dos derivados preparados e 10 µl de enzima solúvel foram suspensas em 1 mL de tampão de ruptura (2% de SDS e 10% de mercaptoetanol) e fervidos durante 10 minutos, em seguida, uma alíquota de 12 µL do sobrenadante foi utilizada nos experimentos. Os géis foram corados com Azul de Coomassie e analisados pelo programa Gel Analyzer. Marcadores de baixo peso molecular foram utilizados (14-95 kDa).

3.2.10 Reações com diferentes substratos

3.2.10.1 Hidrólise do Mandelato de Metila (MM)

Nessa análise, 20 mg dos biocatalisadores preparados foram adicionados a 200 µL de substrato (50 mM) em acetato de sódio - 100 mM (pH 5), fosfato de sódio - 100 mM (pH 7) e carbonato de sódio - 100 mM (pH 9), a 25 ° C, sob agitação contínua. O grau de conversão foi analisado por RP-HPLC (Spectra Physic SP 100 combinado com um detector UV Spectra Physic SP 8450) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm x 0,46 cm). As amostras (20 µL) foram injetadas e eluídas a um fluxo de 1 mL/min, utilizando uma fase móvel constituída por acetonitrila / acetato de amônio 10 mM (35:65 v / v) a pH 2,8. A detecção por UV foi realizada a 230 nm. O tempo de retenção do ácido é de 2,5 min, enquanto o éster tem um tempo de retenção de 10 min. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido mandélico por minuto nas condições descritas acima. A Figura 15 mostra a reação de hidrólise do mandelato de metila.

Figura 15 - Representação esquemática da hidrólise do mandelato de metila.

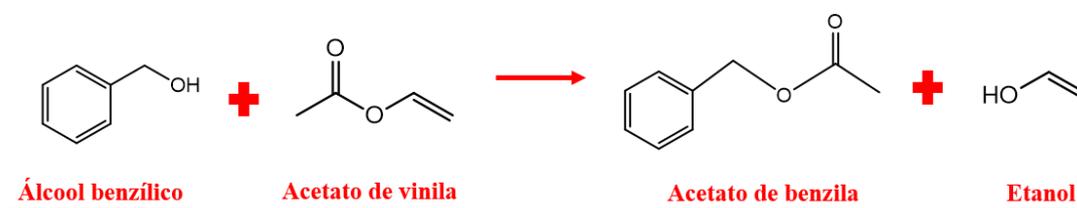


Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.10.2 Síntese enzimática do acetato de benzila

Uma quantidade de 50 mg das preparações imobilizadas foi adicionada a 20 µL de álcool benzílico e 500 µL de acetato de vinila (doador acil) em 2 mL de solução de hexano. Alíquotas foram retiradas após 24 h e analisadas por Cromatografia Gasosa (GC) acoplada com espectômetro de massa usando colunas quirais. A Figura 16 mostra a reação de transesterificação do álcool benzílico.

Figura 16 - Representação esquemática da reação de transesterificação do álcool benzílico usando acetato de vinila como doador acil.



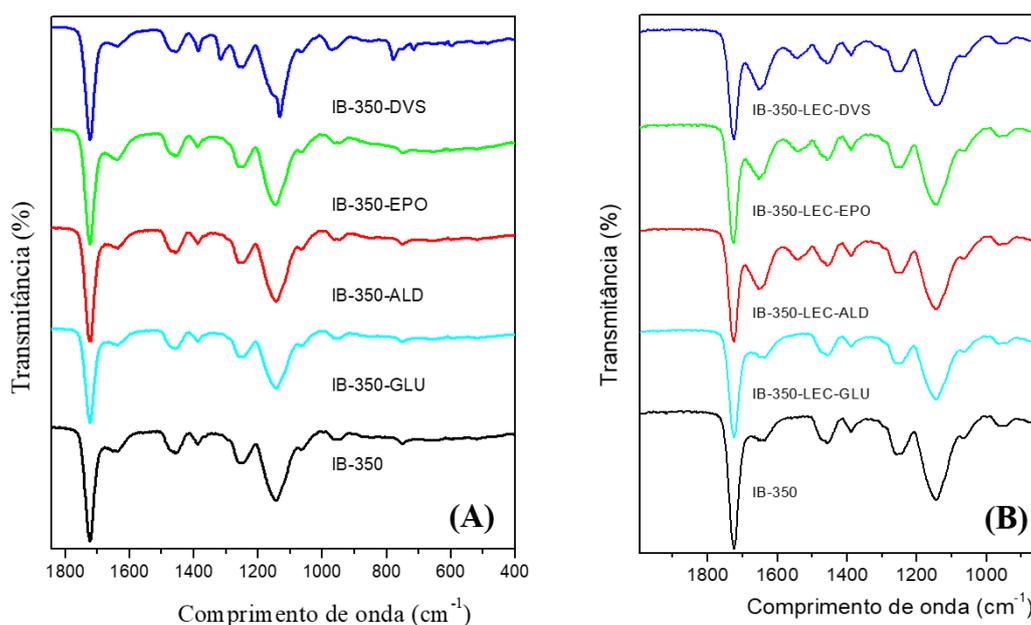
Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 FTIR

Análises de FTIR foram realizadas para caracterizar o IB-350 e avaliar as modificações químicas do suporte antes e após a imobilização com Lecitase. A figura 17A compara os espectros do suporte com e sem modificação, enquanto a figura 17B exibe os espectros da enzima imobilizada nos diferentes suportes. O aparecimento de bandas em 1376 cm^{-1} e 1161 cm^{-1} é característico de ligações C-H e C-O, respectivamente, presentes em todos os grupos do suporte. Na figura 17A (espectro IB-350-DVS), o surgimento do pico em 1100 cm^{-1} representa o grupo S=O, presente na DVS, confirmando a ativação do suporte.

Figura 17 - Espectro de FTIR do suporte IB-350 com e sem modificações, antes (A) e após (B) a imobilização. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 17B, a aparência de uma banda entre 1500 e 1600 cm^{-1} representa a presença de aminas ($-\text{NH}_2$), indicando a ligação da enzima ao suporte. O espectro de IB-350-LEC-GLU não revelou o aparecimento da banda referente às aminas, contudo, os ótimos resultados obtidos com Leci-GLU confirmam a presença da enzima imobilizada no suporte.

Os resultados de análise elementar estão apresentados na Tabela 5. O aumento no conteúdo de carbono para os suportes modificados é devido a maior quantidade desses elementos nos grupos funcionais aldeído, glutaraldeído e divinilsulfona em relação à quantidade de carbono nos grupos epóxi, como pode ser observado nas figuras 14 e 15, indicando que as modificações foram bem-sucedidas. Em relação aos biocatalisadores, observou-se uma maior porcentagem no teor de nitrogênio para essas amostras, confirmando a imobilização da enzima no suporte. Por último, o teor de enxofre foi maior para o suporte ativado com divinilsulfona, assim como para o biocatalisador Leci-DVS, indicando que ativação dessas amostras foi alcançada com sucesso.

Tabela 5 - Conteúdo de elementos (C, H, N e S) do suporte e biocatalisadores por análise elementar. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.

Amostras	Massa (mg)	Porcentagem de massa (%)			
		Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio	Enxofre
IB-350-Epóxi	1,656	23,820	8,545	0,090	1,405
IB-350-Aldeído	2,708	63,080	9,200	0,205	0,000
IB-350-DVS	1,639	60,095	7,785	0,305	3,915
IB-350-GLU	2,526	62,270	9,195	0,135	0,000
Leci-crossA	2,428	62,030	9,095	0,620	0,000
Leci-crossE	2,047	62,035	9,135	0,565	0,000
Leci-DVS	1,512	60,615	8,100	0,765	2,115
Leci-GLU	2,583	62,390	9,175	0,110	0,000

Fonte: Elaborada pela autora.

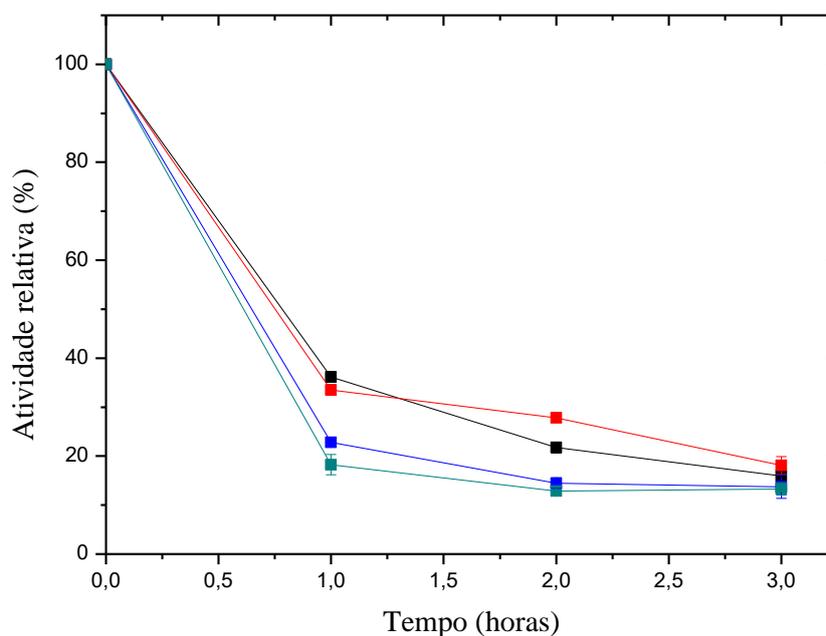
3.3.2 Imobilização da Lecitase seguindo diferentes estratégias

A Figura 18 mostra o curso de imobilização da Lecitase nas diferentes preparações do suporte IB-350. Nas imobilizações por adsorção (Leci-adsE e Leci-adsA) praticamente toda a enzima aderiu ao suporte em apenas 1 hora de imobilização, isso pode ser explicado pela alta hidrofobicidade do suporte que permite uma rápida adsorção interfacial da enzima. (MATTE et al., 2017; ZHAO et al., 2015). Assim, o tempo de 3 horas de imobilização foi mantido para os próximos ensaios. Quando imobilizada em IB-350-DVS e

IB-350-GLU, a atividade enzimática inicial cai de forma mais lenta, no entanto em apenas 3 horas quase toda a enzima é ligada ao suporte.

É importante ressaltar que os métodos de ativação com IB-350 têm sido desenvolvidos pela primeira vez nesse artigo, na literatura apenas foram encontradas modificações com o suporte Immobead-150 (MATTE et al., 2014). Assim, a ativação com EDA seguida de glutaraldeído e divinilsulfona foi uma estratégia desenvolvida para permitir a formação de um braço espaçador com múltiplos grupos que podem interagir com a enzima de formas variadas, dependendo das condições de imobilização (BARBOSA et al., 2013; RIOS et al., 2016). A imobilização por adsorção seguida de *cross-linking* também foi avaliada, normalmente essa técnica é alcançada pela adição de reagentes bi ou multi *cross-linking*, tal como o glutaraldeído (ZHAO et al., 2015).

Figura 18 - Curso de imobilização da Lecitase em diferentes preparações do suporte Immobead-350. (■): Leci-GLU (pH = 7,0 – 25 mM); (■): Leci-DVS (pH = 10,0 – 25 mM); (■): Leci-adsE (pH = 7,0 – 25 mM); (■): Leci-adsA (pH = 7,0 – 25 mM). A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM). As linhas representam a tendência dos dados. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os resultados da Tabela 6, o biocatalisador Leci-GLU apresentou a maior atividade do derivado frente às demais preparações. A imobilização a pH 7 foi estrategicamente escolhida, uma vez que os grupos glutraldeído possuem baixa reatividade em valores de pH alcalino e imobilizações nesse tipo de tipo de suporte são realizadas em pH neutro (BARBOSA et al., 2013). Além disso, a presença do detergente Triton X-100 na concentração 0,01 % foi usada para evitar a formação de dímeros entre as moléculas de enzima (PALOMO et al., 2003).

Comparando com a imobilização covalente no suporte não modificado (Leci-2pE), todas as outras preparações, exceto Leci-DVS, apresentaram maior atividade do derivado e rendimento de imobilização, indicando que as modificações no suporte foram eficientes em formar biocatalisadores ativos.

Tabela 6 - Parâmetros de imobilização da Lecitase imobilizada em diferentes preparações do suporte Immobead-350. Atividade medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM). Carga de imobilização: 50 mg/g de suporte. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.

Estratégia de imobilização/ 25°C	At_i (U/g)	At_f (U/g)	At_d (U/g)	RI (%)
Leci-2pE (pH = 7,0)	173,07 ± 1,8	29,1 ± 1,1	12,7 ± 0,1	83,2
Leci-adsA (pH = 7,0)	171,21 ± 5,1 ^a	23,4 ± 3,3 ^a	15,0 ± 0,7	86,3 ^a
Leci-adsE (pH = 7,0)	180,74 ± 3,9 ^b	24,0 ± 1,8 ^b	17,1 ± 0,9	86,7 ^b
Leci-crossA (pH = 7,0)	171,21 ± 5,1 ^a	23,4 ± 3,3 ^a	14,4 ± 0,14	86,3 ^a
Leci-crossE (pH = 7,0)	180,74 ± 3,9 ^b	24,0 ± 1,8 ^b	14,8 ± 0,5	86,7 ^b
Leci-GLU (pH = 7,0)	209,33 ± 2,3	33,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	84,1
Leci-DVS (pH = 10)	176,65 ± 2,2	31,9 ± 2,8	11,3 ± 0,1	81,9

Fonte: Elaborada pela autora.

At_i: Atividade inicial

At_f: Atividade final

At_d: Atividade do derivado

RI: Rendimento de Imobilização

^a e ^b: Mesma etapa de imobilização, apenas a atividade do derivado muda, por causa do *cross-linking*. Os parâmetros At_i, At_f e Ri são os mesmos.

Os resultados obtidos com divinilsulfona foram os mais baixos, isso pode estar associado com a alta reatividade dos grupos DVS, que, durante a ativação, podem formar

reações secundárias, como hidrólise dos grupos vinílicos ou até mesmo reagir com os outros resíduos do suporte, diminuindo os ligantes disponíveis para imobilização da enzima (RIOS et al., 2016; SCOBLE; SCOPES, 1997). Além disso, é possível que grupos DVS possam continuar reagindo com resíduos de aminoácidos da enzima já imobilizada, desestabilizando sua estrutura tridimensional, mesmo após a reação de bloqueio com borohidreto de sódio (DOS SANTOS et al., 2015a).

Outro aspecto a ser observado é que os derivados preparados por adsorção seguida de *cross-linking* mantiveram uma atividade final alta, mesmo após a segunda etapa de ativação. Porém, apesar de todos os biocatalisadores terem apresentado uma elevada atividade do derivado e um alto rendimento de imobilização, ensaios de estabilidade também serão testados para avaliar a eficiência da ligação entre enzima e suporte.

3.3.3 Estabilidade térmica e em solvente orgânico

A temperatura e a presença de solventes orgânicos no meio podem influenciar significativamente a estabilidade enzimática, dependendo das condições de inativação. Além disso, a estabilidade do biocatalisador depende de diversos fatores como o tipo de ligação entre enzima e suporte, a rigidez da estrutura da enzima imobilizada, o tamanho do braço espaçador do suporte, o grau de ativação do suporte, dentre outros (BRADY; JORDAAN, 2009; RIOS et al., 2016; SANTOS et al., 2015c). Valores elevados de pH, temperatura e concentração de solventes podem promover alterações na ionização enzimática ou no equilíbrio de hidrofobicidade/ hidrofiliicidade, levando a uma hiperativação ou desativação da enzima (PETERSON et al., 2007; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

Nesse contexto, foi realizado o ensaio de estabilidade térmica e em solvente dos derivados para testar a eficiência do processo de imobilização. De acordo com a Tabela 7, o derivado mais estável foi Leci-GLU, que apresentou os maiores tempos de meia-vida, tanto na temperatura de 65 °C, como na presença de acetonitrila. Esse derivado foi cerca de 29 vezes mais estável que a enzima livre a 65 °C e quase 2 vezes mais estável que a mesma em acetonitrila 30 %.

Em comparação com a preparação Leci-2pE, na qual a imobilização da enzima ocorreu por meio de ligação covalente no suporte IB-350 diretamente ativado com grupos epóxi (suporte nativo), o derivado Leci-GLU foi muito mais estável, já que Leci-2pE não

apresentou atividade na temperatura de 65 °C e, na presença de acetonitrila 30 %, Leci-GLU exibiu um tempo de meia-vida cerca 13 vezes maior. Essa condição pode ser explicada porque a adição dos grupos glutaraldeído no suporte já aminado fornece muitas porções de interação entre as moléculas de enzima e suporte, permitindo alcançar uma forte ligação covalente multipontual. (BARBOSA et al., 2014; RIOS et al., 2016; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Assim, a preparação do biocatalisador promoveu uma forte interação enzima-suporte, que impediu a inativação da enzima devido a uma maior estabilização da sua estrutura tridimensional (LIMA et al., 2015b) em comparação com o derivado Leci-2pE.

Tabela 7 - Tempos de meia-vida dos biocatalisadores produzidos em variados protocolos de imobilização, sob diferentes condições de inativação. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.

Amostras	65 °C - pH 7,0	Acetonitrila 30 %
Enzima livre	3,9 min ± 0,2	24 h ± 1,2
Leci-2pE	< 1 min	3,3 h ± 0,2
Leci-adsA	< 1 min	1,7 h ± 0,1
Leci-adsE	< 1 min	1,4 h ± 0,1
Leci-DVS	< 1 min	0,5 h ± 0,02
Leci-crossA	1,0 h ± 0,07	22,6 h ± 0,9
Leci-crossE	1,0 h ± 0,06	22,8 h ± 1,1
Leci-GLU	1,9 h ± 0,07	42,6 h ± 2,3

Fonte: Elaborada pela autora.

Seguido do derivado Leci-GLU, os maiores tempos de meia-vida foram alcançados com Leci-crossA e Leci-crossE. Na temperatura de 65 °C, os biocatalisadores com *cross-linking* foram mais estáveis que a enzima livre por um fator de 14 vezes, enquanto que os derivados que foram apenas adsorvidos no suporte IB-350 com grupos aldeído e grupos epóxi (Leci-adsA e Leci-adsE, respectivamente) não mantiveram atividade nessa temperatura.

Com relação à imobilização por adsorção, tem sido reportado na literatura que apesar de ser um método simples e barato, ele possui algumas limitações, ao passo que a enzima pode facilmente desorver do suporte em altas temperaturas e na presença de solventes orgânicos (BRADY; JORDAAN, 2009). Já enzimas que são previamente imobilizadas por adsorção em um suporte e, em seguida, reticuladas com glutaraldeído, por exemplo, aumentam sua estabilidade, uma vez que esse passo previne a desorção da enzima e mantém a sua conformação inalterada (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

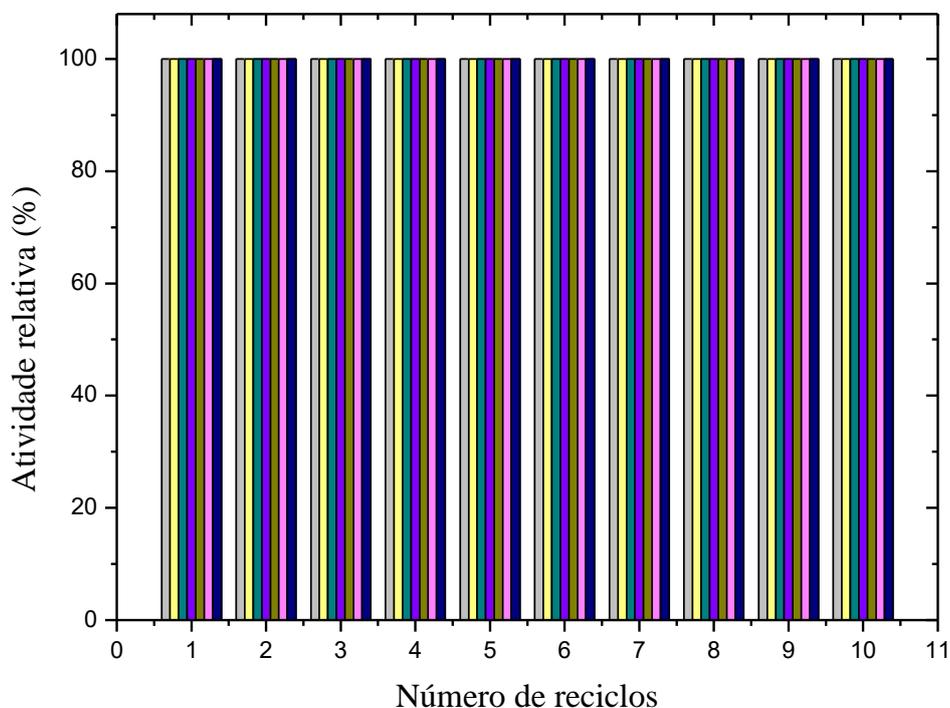
O biocatalisador Leci-DVS também não manteve atividade na temperatura de 65 °C, indicando que essa preparação não foi tão eficiente quanto a imobilização da Lecitase em IB-350-GLU, já que ambas foram desenvolvidas para favorecer a formação de ligações covalentes multipontuais entre enzima e suporte. Provavelmente essa preparação não foi capaz de promover um forte estabilização e rigidificação da estrutura da enzima e, assim, obteve uma menor estabilidade frente aos demais biocatalisadores (BARBOSA et al., 2013; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

3.3.4 Estabilidade operacional

Nesse tópico, os derivados foram testados quanto a sua estabilidade operacional. Os biocatalisadores foram submetidos a 10 ciclos consecutivos de reuso e a atividade foi determinada pela hidrólise do *p*-NPB em cada ciclo de reação. Os resultados são apresentados na Figura 19 a seguir.

O gráfico de barras mostra que os biocatalisadores foram altamente eficientes quanto à estabilidade operacional, desde que não houve queda da atividade enzimática ao longo dos 10 ciclos reacionais. Assim, é possível confirmar que as diferentes estratégias de imobilização da Lecitase foram eficientes e promoveram biocatalisadores robustos com elevada atividade e possibilidade de reuso por muitos ciclos de reação, sem a perda da atividade inicial. De acordo com Mihailovic et al., (2014), um dos aspectos mais importantes para o desenvolvimento de diferentes suportes para a imobilização enzimática é a sua possível reutilização em ciclos de batelada repetidos ou em processo contínuo. A possibilidade de reutilização do biocatalisador é um fator crucial para viabilizar economicamente os processos biocatalíticos.

Figura 19 - Estabilidade operacional dos derivados (■): Leci-GLU, (□): Leci-crossE e (■): Leci-crossA, (■): Leci-DVS, (■): Leci-adsE, (■): Leci-adsA e (■): Leci-2pE. A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM). Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.5 Estabilidade de estocagem

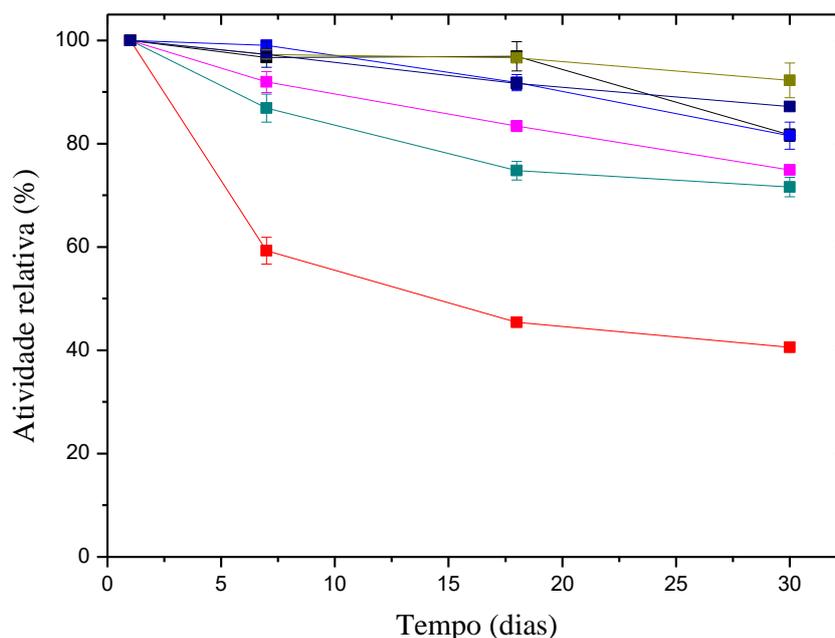
Os dados da Figura 20 mostram que ao longo de 30 dias de estocagem, os derivados armazenados à 4 °C mantiveram uma alta atividade em relação à inicial, exceto o biocatalisador Leci-DVS, que no trigésimo dia perdeu 60 % da sua atividade inicial. A baixa estabilidade desse derivado, que vem sendo observada ao longo do trabalho, provavelmente é decorrente da não estabilização das ligações entre a Lecitase e os grupos Divinilsulfona, que possivelmente não promoveram uma rigidificação tão eficaz da estrutura da enzima ou até mesmo o processo de imobilização alterou a conformação da mesma, dificultando a catálise.

Seguido de Leci-DVS, os derivados que tiveram maior queda na atividade foram Leci-adsE, e Leci-adsA, mas, ainda assim, cerca de 80 % da atividade inicial foi mantida. Essa perda da atividade pode ser devido às fracas interações que são envolvidas na

imobilização por adsorção física, levando à dessorção de uma parte das enzimas ligadas ao suporte durante longos períodos de armazenamento (CANTONE et al., 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Os demais biocatalisadores imobilizados por meio de ligação covalente (Leci-GLU e Leci-2pE) e *cross-linking* (Leci-crossE e Leci-crossA) permaneceram com quase 100 % da atividade inicial. Sabe-se que a ligação covalente é largamente utilizada para imobilização de enzimas, desde que esse método forma ligações estáveis entre enzima e suporte e previne a liberação na enzima no meio (BEZERRA et al., 2015; CANTONE et al., 2013; RIOS et al., 2016; SHELDON, 2007).

Figura 20 - Estabilidade de estocagem dos derivados (■): Leci-GLU, (■): Leci-DVS, (■): Leci-2pE, (■): Leci-adsE, (■): Leci-adsA, (■): Leci-crossE e (■): Leci-crossA, armazenados à 4 °C. A atividade foi medida através da hidrólise do p-NPB (50 mM). As linhas representam a tendência dos dados. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.



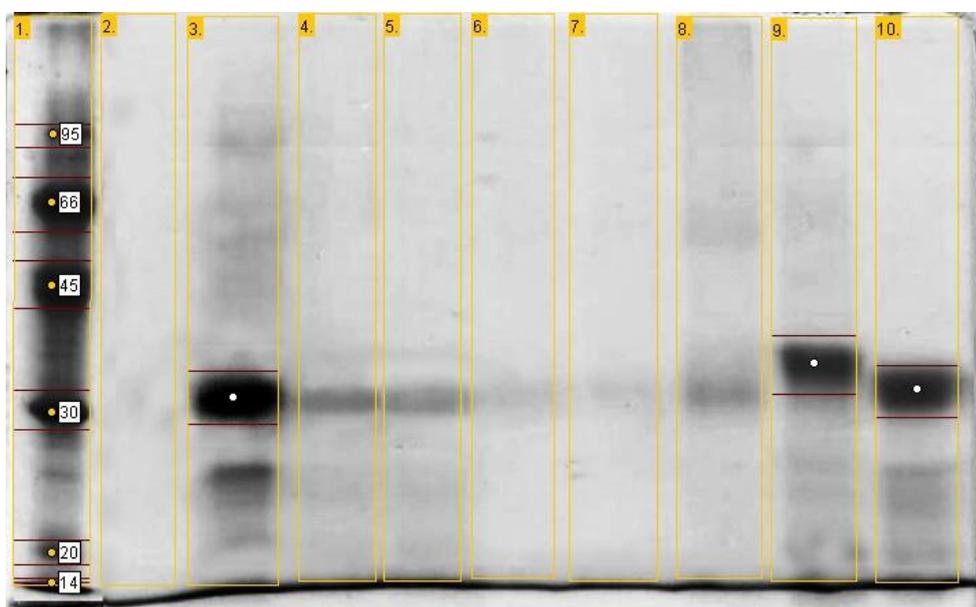
Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.6 SDS-PAGE

A análise de eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS) foi realizada para confirmar os tipos de ligações envolvidas entre enzima e suporte nos diferentes

derivados preparados. A tabela 11 no ANEXO A mostra os pesos moleculares correspondentes às bandas que foram detectadas pelo programa Gel Analyzer. A Lecitase Ultra apresenta peso molecular de 26 KDa. Na figura 21, as faixas 4, 5 e 8 não apresentaram bandas padrões de proteínas, confirmando a formação da ligação colvalente multipontual nos derivados Leci-DVS, Leci-GLU e Leci-2pE.

Figura 21 - Análise de SDS-PAGE. Os experimentos foram realizados como descrito na Secção 2.3.9. Faixa 1: marcador de baixo peso molecular, Faixa 3: enzima livre, Faixa 4: Leci-DVS, Faixa 5: Leci-GLU, Faixa 6: Leci-crossE, Faixa 7: Leci-crossA, Faixa 8: Leci-2pE, Faixa 9: Leci-adsE, Faixa 10: Leci-adsA. Edição feita pelo programa Gel Analyzer. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

As faixas 6 e 7 correspondem aos *cross-linkings* (Leci-crossA e Leci-crossE, respectivamente) e, assim como nos biocatalisadores preparados por meio de ligação covalente, a enzima permaneceu ligada ao suporte, já que não foram detectadas proteínas no gel. Nesse caso, a adição do reagente glutaraldeído, permitiu a formação de ligações cruzadas entre as próprias enzimas, e também o suporte, formando uma malha de ligações estáveis que impede a liberação da enzima no meio (MATEO et al., 2007b). Adlercreutz (2013), relatou que a estratégia de adsorção seguida pela reticulação da enzima adsorvida reduz o risco de dessorção de mesma do suporte.

Por último, as bandas 9 e 10, que correspondem aos derivados Leci-adsA e Leci-adsE, respectivamente, apresentaram uma tonalidade consideravelmente forte no gel de eletroferese, comprovando a utilização do método de adsorção física para imobilizar a enzima nos suportes ativadas com grupos epóxi e aldeído. De acordo com Brady e Jordaan (2009), a adsorção é um método de imobilização bastante utilizado por ser relativamente simples e barato, além de não modificar quimicamente a enzima, porém apresenta algumas limitações à medida que a enzima tende a se desligar do suporte em altas temperaturas, solventes orgânicos, alta força iônica, etc (BEZERRA et al., 2015; SHELDON; VAN PELT, 2013).

3.3.7 *Atividade versus diferentes substratos*

Diversos trabalhos na literatura relatam que o processo de imobilização pode ser utilizado como uma ferramenta para modular as propriedades das enzimas, como atividade, estabilidade e seletividade (RIOS et al., 2016; SANTOS et al., 2015d). Variações nas condições de imobilização (protocolos de imobilização, modificações químicas do suporte) determinam as interações físicas entre enzima-suporte e a conformação final da enzima, produzindo biocatalisadores com diferentes propriedades (SANTOS et al., 2015d).

Nesse trabalho, os derivados foram aplicados em reações de hidrólise e transesterificação (acetilação), a fim de avaliar a versatilidade dos biocatalisadores *versus* diferentes substratos em diferentes reações. Os substratos selecionados foram ácido mandélico, um composto quiral com isômeros R e S (reação de hidrólise), e o álcool benzílico (reação de acetilação). O acetato de benzila, produto da segunda reação, é bastante utilizado na indústria de perfumaria alimentos e química (MAJUMDER et al., 2006).

Nas reações com mandelato de metila, três diferentes condições de pH (5, 7 e 9) foram testadas para avaliar o efeito das interações entre enzima e suporte. Os melhores resultados foram obtidos com o derivado Leci-GLU, que apresentou uma elevada atividade nas três diferentes condições, enquanto as demais preparações exibiram baixa atividade a pH 5. Contudo, Leci-crossA foi a preparação mais ativa nos pHs 7 e 9, exibindo uma atividade 2,9 e 1,2 vezes maior que o derivado Leci-2pE, respectivamente. Leci-crossE e Leci-GLU também obtiveram elevadas atividades nesses pHs.

Tabela 8 - Atividade de diferentes preparações de Lecitase *versus* diferentes substratos. MM: Mandelato de Metila. Atividade está representada em U/mg. Outras especificações estão descritas em materiais e métodos.

Amostras	pH 5/R-MM (V_R/V_S)	pH 7/R-MM (V_R/V_S)	pH 9/R-MM (V_R/V_S)	Álcool benzílico
Leci-2pE	2,1 ± 0,1 (0,53 ± 0,1)	9,8 ± 0,5 (0,85 ± 0,1)	18,6 ± 0,9 (0,96 ± 0,1)	0,2 ± 0,1
Leci-adsE	3,3 ± 0,2 (0,41 ± 0,1)	25,9 ± 2,2 (0,84 ± 0,1)	24,7 ± 1,3 (1,01 ± 0,1)	1,7 ± 0,1
Leci-adsA	5,3 ± 0,4 (0,55 ± 0,1)	29,3 ± 2,3 (1,03 ± 0,1)	23,1 ± 1,3 (0,89 ± 0,1)	0,8 ± 0,0
Leci-crossA	4,2 ± 0,4 (0,53 ± 0,1)	28,4 ± 2,3 (0,93 ± 0,1)	23,5 ± 2,2 (0,91 ± 0,1)	0,9 ± 0,0
Leci-crossE	3,5 ± 0,1 (0,67 ± 0,1)	24,7 ± 1,8 (0,86 ± 0,1)	23,1 ± 1,9 (0,93 ± 0,1)	1,0 ± 0,1
Leci-GLU	25,6 ± 1,7 (6,6 ± 0,4)	26,2 ± 2,4 (3,53 ± 0,2)	22,2 ± 2,2 (0,90 ± 0,1)	2,1 ± 0,1
Leci-DVS	1,7 ± 0,2 (0,39 ± 0,1)	17,1 ± 1,2 (1,01 ± 0,1)	19,9 ± 1,1 (0,85 ± 0,1)	1,1 ± 0,1

*Atividade (x10³)

Fonte: Elaborada pela autora.

Como o mandelato de metila é um substrato mais complexo, com dois isômeros (R e S), é importante avaliar a preferência dos derivados por um deles. Pelos dados da Tabela 8, verifica-se que quase todas as preparações tiveram maior afinidade pelo enantiômero S, apenas Leci-GLU apresentou maior seletividade pelo isômero R nos pHs 5 ($V_R/V_S = 6,6$) e 7 ($V_R/V_S = 3,53$). Enquanto Leci-adsE e Leci-adsA não exibiram preferência por nenhum dos enantiômeros a pH 9 ($V_R/V_S = 1,01$) e 7 ($V_R/V_S = 1,03$), respectivamente. Dos santos et al. (2014) estudaram a atividade da Lecitase imobilizada em octyl-agarose *versus* o substrato mandelato de metila e os resultados mostram uma preferência pelo isômero S, com razões (V_R/V_S) por volta de 0,5 a pH 5 e 7 e 0,26 a pH 8,5.

Usando álcool benzílico como substrato para a reação de transesterificação, a preparação mais ativa foi Leci-GLU (At = 2,1 U/mg), que apresentou atividade 10,5 vezes maior que Leci-2pE. A utilização de catalisadores enzimáticos evita as desvantagens

associadas com a síntese química desse produto, que é realizada por acetoxilação de tolueno, utilizando catalisadores inorgânicos. Essa reação gera produtos indesejáveis, além de levar a desativação do catalisador (MAJUMDER et al., 2006).

3.4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que as estratégias de ativação do IB-350 foram eficientes e que a imobilização da Lecitase Ultra nas diferentes preparações do suporte produziram biocatalisadores com elevada atividade, estabilidade térmica e na presença de solvente orgânico. Quando comparados com a enzima solúvel, os derivados Leci-GLU, Leci-crossA e Leci-crossE foram cerca de 29,2; 15,38 e 15,38 vezes mais estáveis termicamente, enquanto na presença de 30% de acetonitrila, o derivado de Leci-Glu obteve um tempo de meia-vida quase duas vezes maior que o da enzima livre. Além disso, os biocatalisadores também foram capazes de participar de 10 ciclos reacionais consecutivos, mantendo sua atividade relativa inalterada (100%), o que indica a eficácia dessas preparações para aplicações industriais que exigem a reutilização do biocatalisador.

No que diz respeito à versatilidade catalítica dos derivados, foram obtidos altos valores de atividade para a reação de hidrólise com o mandelato de metila, a pH 7 e 10, e a maioria dos derivados apresentaram preferência pelo isômero S. Na acetilação do álcool benzílico, todos os biocatalisadores conseguiram sintetizar o acetato de benzila, contudo Leci-GLU apresentou a maior atividade (2,1 U / mg).

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406–36, 2013.
- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.
- ALAGÖZ, D. et al. Covalent immobilization of *Candida methylca* formate dehydrogenase on short spacer arm aldehyde group containing supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 40–47, 2016.
- ALVES, J. S. et al. Use of Lecitase-Ultra immobilized on styrene-divinylbenzene beads as catalyst of esterification reactions: Effects of ultrasounds. **Catalysis Today**, v. 255, p. 27–32, 2015.
- BABICH, L. et al. Continuous-flow reactor-based enzymatic synthesis of phosphorylated compounds on a large scale. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 21, p. 6604–6609, 2012.
- BARBOSA, O. et al. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220–1227, 2012.
- BARBOSA, O. et al. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 2013.
- BARBOSA, O. et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583–1600, 2014.
- BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**, v. 23, n. 17, p. 3627–3636, 2002.
- BEZERRA, C. S. et al. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 42125, p. 1–15, 2015.
- BEZERRA, R. M. et al. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 125, p. 104–115, 2017.
- BORRELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774–20840, 2015.

- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnol Lett**, v. 31, p. 1639–1650, 2009.
- BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. **Methods in molecular biology**, v. 1051, p. 15–31, 2013.
- BRÍGIDA, A. I. S. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 67–80, 2007.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 1, p. 309–319, 1938.
- BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. **Biocatalysis and enzyme technology**. Focus on catalysis. 2005, 431p.
- CANILHO, N. et al. Isocyanate-mediated covalent immobilization of *Mucor miehei* lipase onto SBA-15 for transesterification reaction. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 139–145, 2013.
- CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262–76, 2013.
- CLAUSEN, K. Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 103, p. 333–340, 2001.
- CUNHA, A. G. et al. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase - A comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1–3, p. 49–56, 2008.
- DE ABREU, L. et al. Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 51–55, 2014.
- DE CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quimica Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.
- DE MARIA, L. et al. Phospholipases and their industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 290–300, 2007.
- DE MATOS, L. J. B. L. **Imobilização da lipase tipo b de *Candida antarctica* em sílica macroporosa e polimetilmetacrilato visando a síntese do oleato de etila**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2014.
- DEEPTHI, S. S. et al. A Green Approach towards the Synthesis of Enantio Pure Diols Using

Horse Radish Peroxidase Enzyme Immobilized on Magnetic Nanoparticles. v. 2014, n. February, p. 15–19, 2014.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 41–55, 2008.

DHAKE, K. P. et al. Immobilization of steapsin lipase on macroporous immobead-350 for biodiesel production in solvent free system. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 5, p. 959–965, 2012.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Stabilizing hyperactivated lecithase structures through physical treatment with ionic polymers. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1511–1515, 2014a.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Improving the catalytic properties of immobilized Lecithase via physical coating with ionic polymers. **Enzyme and microbial technology**, v. 60, p. 1–8, 2014b.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Adv.**, v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015a.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 117, p. 38–44, 2015b.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, v. 14, p. 16–26, 2017.

DOS SANTOS, J. C. S. S. et al. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **Process Biochemistry**, v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015c.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups . A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 15, n. August 1992, p. 546–550, 1993.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 405–418, 2009.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Effect of the immobilization protocol in the activity, stability, and enantioselectivity of Lecithase® Ultra. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, n. 3, p. 99–104, 2007a.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Improved Catalytic Properties of Immobilized Lipases

by the Presence of Very Low Concentrations of Detergents in the Reaction Medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 242–250, 2007b.

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

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Lecitase® ultra as regioselective biocatalyst in the hydrolysis of fully protected carbohydrates: Strong modulation by using different immobilization protocols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3, p. 110–117, 2008b.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GARCIA-GALAN, C. et al. Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 604–616, 2014.

GIANFREDA, L.; SCARFI, M. Enzyme stabilization: state of the art. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 100, n. 2, p. 97–128, 1991.

GONÇALVES, K. M. et al. A Comprehensive Study on the Activity and Deactivation of Immobilized Lecitase Ultra in Esterifications of Food Waste Streams to Monoacylglycerols. **ChemSusChem**, v. 6, n. 5, p. 872–879, maio 2013.

GONÇALVES, K. M. et al. Nanoencapsulated Lecitase Ultra and *Thermomyces lanuginosus* Lipase, a Comparative Structural Study. **Langmuir**, v. 32, n. 26, p. 6746–6756, 2016.

GUAUQUE TORRES, M. D. P.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 25, 2013.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. Second edi ed. Madrid, Spain: [s.n.].

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, 2004.

GURUNG, N. et al. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009.

- HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 107–122, 2011.
- HERNANDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 1, p. 72–78, 2011.
- HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in Mesoporous Silicates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 45, p. 8582–8594, 2008.
- JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390–397, 2002.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.
- JEMLI, S. et al. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. **Critical reviews in biotechnology**, v. 8551, p. 1–13, 2014.
- KLEIN, M. P. et al. Effect of the Support Size on the Properties of β -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. v. 13, p. 2456–2464, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LERESCHE, J. E.; MEYER, H.; AG, L. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist Abstract: **Organic Process Research & Development**, v. 10, p. 572–580, 2006.
- LI, Y. et al. Adsorption and catalytic activity of Porcine pancreatic lipase on rod-like SBA-15 mesoporous material. **Physicoche Eng. Aspects**, v. 341, p. 79–85, 2009.
- LIM, C. W. et al. Modeling and optimization of phospholipase A1-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine using response surface methodology for lysophosphatidylcholine production. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 1, p. 35–41, 2015.
- LIMA, L. N. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, p. 523–535, 2015a.
- LIMA, L. N. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic

supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent - free systems. p. 523–535, 2015b.

LISZKA, M. J. et al. Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 3, n. 1, p. 77–102, 2012.

LIU, N. et al. Immobilization of Lecitase® Ultra onto a novel polystyrene DA-201 resin: Characterization and biochemical properties. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 5, p. 1108–1120, 2012.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 1839–1842, 2005.

LV, Y. et al. Preparation of reusable bioreactors using reversible immobilization of enzyme on monolithic porous polymer support with attached gold nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, p. 50–58, 2014.

MAJUMDER, A. B. et al. Lipase catalyzed synthesis of benzyl acetate in solvent-free medium using vinyl acetate as acyl donor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 15, p. 4041–4044, 2006.

MANOEL, E. A. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015.

MANOEL, E. A. et al. Design of a core–shell support to improve lipase features by immobilization. **RSC Adv.**, v. 6, n. 67, p. 62814–62824, 2016.

MATEO, C. et al. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 739–745, 2000.

MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 274–280, 2006.

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

MATEO, C. et al. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1022–1033, 2007b.

MATEO, C. et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-

- stabilization. **Biochemical Society transactions**, v. 35, p. 1593–1601, 2007c.
- MATTE, C. R. et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by different techniques on Immobead 150 support: Characterization and applications. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 172, n. 5, p. 2507–2520, 2014.
- MATTE, C. R. et al. Physical-Chemical Properties of the Support Immobead 150 Before and After the Immobilization Process of Lipase. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 28, n. 8, p. 1430–1439, 2017.
- MELANDER, W. R.; CORRADINI, D.; HORVÁTH, C. Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic-interaction chromatography. Application of solvophobic theory. **Journal of Chromatography A**, v. 317, p. 67–85, 1984.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119–134, 2012.
- MIHAILOVIC, M. et al. Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization. v. 49, p. 637–646, 2014.
- MISHRA, M. K. et al. Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, n. 24, p. 2854–2860, 2009.
- MUSTRANTA, A.; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. Comparison of lipases and phospholipases in the hydrolysis of phospholipids. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 5, p. 393–401, 1995.
- PALOMO, J. M. et al. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2003.
- PALOMO, J. M. et al. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1–2, p. 267–273, 2004.
- PALOMO, J. M. et al. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447–454, 2005.
- PETERSON, M. E. et al. The dependence of enzyme activity on temperature : determination and validation of parameters. v. 337, p. 331–337, 2007.
- PRAKASH, D. et al. Actinomycetes: A repertory of green catalysts with a potential revenue resource. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 207–219, 2009.

- REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 2, p. 145–150, 2002.
- RIOS, N. S. et al. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R,S)-Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 246–258, 2016.
- RIOS, N. S. et al. Chemical Engineering Research and Design Pore-expanded SBA-15 for the immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B: Application in esterification and hydrolysis as. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 9, p. 12–24, 2017.
- RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 100–109, 2008.
- RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 963–968, 2009.
- RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013a.
- RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013b.
- RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2216–2238, 2011.
- RUEDA, N. et al. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. **RSC Adv.**, v. 5, n. 15, p. 11212–11222, 2015.
- RUEDA, N. et al. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. **Catalysis Today**, v. 259, p. 107–118, 2016.
- 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.
- SALIS, A. et al. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 1–2, p. 19–26, 2008.
- SANTOS, J. C. S. et al. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool

to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Adv.**, v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015a.

SANTOS, J. C. S. D. et al. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 2015b.

SANTOS, J. C. S. DOS et al. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 2015c.

SANTOS, J. C. S. DOS et al. Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 77, p. 1–7, 2015d.

SCOBLE, J. A.; SCOPES, R. K. Ligand structure of the divinylsulfone-based T-gel. **Journal of Chromatography A**, v. 787, p. 47–54, 1997.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289–1307, jun. 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SING, K. S. W. et al. International union of pure and applied chemistry(IUPAC). **Pure Appl. Chem.**, v. 57, p. 603–619, 1985.

SINGH, R. K. et al. From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1232–1277, 2013.

SINGH, V.; TYAGI, R. Investigations of mixed surfactant systems of lauryl alcohol-based bisulfosuccinate anionic gemini surfactants with conventional surfactants: A fluorometric study. **Journal of Taibah University for Science**, v. 9, p. 477–489, 2015.

STEPANKOVA, V. et al. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2823–2836, 2013.

SUN, J. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. **New BIOTECHNOLOGY**, v. 27, n. 1, p. 53–58, 2010.

TANOKURA, M. et al. Structural analysis of enzymes used for bioindustry and bioremediation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 79, n. 9, p. 1–11, 2015.

TURKOVÁ, J. et al. Methacrylate gels with epoxide groups as supports for immobilization of enzymes in pH range 3–12. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 524, n. 1, p. 162–169, 1978.

VILARRASA-GARCIA, E. et al. Microporous and Mesoporous Materials CO₂ adsorption

- on amine modified mesoporous silicas : Effect of the progressive disorder of the honeycomb arrangement. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 209, p. 172–183, 2015.
- VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: Influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 13, p. 6436–6441, 2005.
- WANG, Y. J.; WU, T. C.; CHIANG, C. L. Effect of pore size distribution on enzyme immobilization in porous supports. **AIChE Journal**, v. 35, n. 9, p. 1551–1554, 1989.
- WHEATLEY, J. B.; SCHMIDT, D. E. Salt-induced immobilization of proteins on a high-performance liquid chromatographic epoxide affinity support1. Wheatley JB, Schmidt DE. Salt-induced immobilization of proteins on a high-performance liquid chromatographic epoxide affinity support. **Journal of Chromatography A**, v. 644, n. 1, p. 11–16, 1993.
- WHEATLEY, J. B.; SCHMIDT, D. E. Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. **Journal of Chromatography A**, v. 849, n. 1, p. 1–12, 1999.
- YANG, J. G. et al. Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 101–104, 2006.
- ZHANG, J. et al. Recent developments in lipase-catalyzed synthesis of polymeric materials. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 797–806, 2014.
- ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182–197, 2015.

ANEXO A

Tabela 9 - Valores de CMC do Triton X-100 e SDS.

Surfactante	CMC (mM)	Referências
Triton X-100	0,24 - 0,27	(SINGH; TYAGI, 2015)
SDS	8,0 - 8,2	(SINGH; TYAGI, 2015)

Tabela 10 - Dados da análise de eletroforese, com peso molecular (MW) de cada banda identificada no gel. Dados obtidos pelo Gel Analyzer – Resultados 1.

LINHA	BANDA	rf	VOLUME	MW
1.	1.	0.201	3094	95
1.	2.	0.321	8334	66
1.	3.	0.469	8145	45
1.	4.	0.677	6656	30
1.	5.	0.922	4380	20
1.	6.	0.983	3479	14
3.	1.	0.687	5243	28
8.	1.	0.684	2706	28
9.	1.	0.679	5740	28

Tabela 11 - Dados da análise de eletroforese, com peso molecular (MW) de cada banda identificada no gel. Dados obtidos pelo Gel Analyzer – Resultados 2.

LINHA	BANDA	rf	VOLUME	MW
1.	1.	0.206	3210	95
1.	2.	0.327	9323	66
1.	3.	0.472	8535	45
1.	4.	0.695	6825	30
1.	5.	0.943	2850	20
1.	6.	0.995	685	14
3.	1.	0.67	10967	29
9.	1.	0.612	9342	33
10.	1.	0.655	9359	30